

PCT Patent Application WO 98/27991
Publication date: Jul 02, 1998.

International class (6): A 61 K 35/74; A 23 L 1/03 and 1/308;
A 23 C 19/032.

(21) International application number: PCT/FR97/02399.
Application date: Dec 23, 1997.

Priority information:
-- FR 96/15977, Dec 24, 1996.
-- FR 97/08885, Jan 28, 1997.

Applicant (for all states other than U.S.):
Laboratoires Standa S.A., of France.

Inventors: Edmond Roussel, Charles Gabriel Legrand,
Marc Henri Legrand, and Nathalie Roland, all of France.

[etc.etc.]

Title (as stated in English):

Absorbable composition containing propionic bacteria
capable of releasing nitric oxide in the human or
animal alimentary canal.

Abstract: (See English Abstract provided.)

-- Page 1 --

[Specification]:

The invention relates to a current feeding composition or an absorbable dietetic or medicinal composition comprised of propionic bacteria capable of releasing physiologically significant amounts of nitric oxide in a human or animal alimentary canal.

For many decades there was complete neglect of the fact that nitric oxide [(NO)] is one of the elements necessary for life and the maintenance of life; accordingly, until the past 4 or 5 years researchers did not direct their efforts toward the benefits associated with the presence of this oxide, in medicine, in nutrition, and in physiology.

It is only recently that an impressive number of physiological functions have been attributed to nitric oxide and that the hypothesis has been expressed that the gas may be a prime participant in functions as diverse as control of arterial pressure, the nonspecific cytotoxic function of macrophages, the aggregation of platelets, and neurotransmission; also, the control of mobility

in the alimentary canal.

With this hypothesis as a basis, research relating to nitric oxide has expanded greatly, and the importance of the gas has been confirmed.

It is known that nitric oxide, which is a very unstable gas (half life less than 5 seconds in biological systems), is a product of interior biosynthesis in human and animal organisms, originating from L-arginine, with the aid of a group of enzymes called NO-synthases (NOS). There are two principal types of NOSs. The first comprises the constituent NOSs which are expressed particularly in the endothelial cells, blood platelets, and neurons. The second type comprises inducible NOSs, which are expressed principally by certain cells of the immune system (particularly macrophages and

-- Page 2 --

polynuclear cells), by smooth vascular muscle cells, and endothelial cells [(evidently NOSs of both types are associated with endothelial cells)].

It should be noted that production of NO by the inducible NOSs is a number of orders of magnitude greater than that by the constituent NOSs; but in all cases the production is somewhat small.

In view of the abovementioned beneficial role of nitric oxide, it would be desirable to increase its production, particularly by using the natural means of metabolism in the alimentary canal.

Until the present, no means of accomplishing this result have been proposed.

The object of the present invention is to remedy this situation.

According to the invention, the stated object can be achieved by recognizing that, surprisingly, bacteria of a particular type, the "propionic bacteria", are capable of producing nitric oxide, and that among these bacteria certain species and certain strains within these species are capable of producing large quantities of nitric oxide.

The bacteria of concern here are propionic bacteria which are not present in the group of lactic bacteria or bifidobacteria which are classically introduced into the organism by lacteal desserts or other fermented dairy products, but which have been present in human food for centuries. They are essentially propionic bacteria which enable one to obtain the holes in emmentaler or Swiss cheese during cheese production; these cheeses contain about 10^{10} cells/gram of propionic bacteria, when the maturation of the cheese is complete.

It should be noted that the fermentation of these bacteria produces, inter alia, propanoic acid (also known as "propionic acid"), acetic acid, and carbon dioxide.

The abovementioned discovery is the more surprising in that one can verify that lactic bacteria, bifidobacteria, and/or yeasts, as used currently in the food and feed domain, do not produce nitric oxide.

-- Page 3 --

Accordingly, the invention relates to the use of propionic bacteria to obtain a current feeding composition or an absorbable dietetic or medicinal composition capable of releasing physiologically significant amounts of nitric oxide in a human or animal alimentary canal.

According to the invention, this composition may be comprised of a preparation which is prepared and/or present, in the liquid form (particularly a fermented liquid), in a dehydrated form, or in an intermediate state of hydration.

More precisely, it should be noted that, without departing from the scope of the invention, the composition may comprise:

- a specific preparation justified by a solely physiological purpose, namely ingestion of propionic bacteria capable of producing physiologically significant quantities of nitric oxide;

- a food or feed preparation which is a prepared foodstuff which also has another purpose which is strictly energetic or functional.

In the latter case, the propionic bacteria may be added to or incorporated in food or feed, e.g.: cheese, food fibers such as cereal flakes, or fermented milks, dessert creams, cakes, or beneficial beverages.

According to the invention, the propionic bacteria may be introduced in the form of biomass or a yeast or ferment which can multiply in situ.

When dehydrated, the composition is present, advantageously, in the form of individual fractions which contain the dose of bacteria intended to be regularly absorbed.

These factions can be directly ingested or can be first diluted in a liquid. They may be prepared in a form facilitating absorption; e.g., as a compressed tablet, a sachet containing granulated powder, a liquid, etc.

-- Page 4 --

It has been verified that when such dehydrated concentrated preparations of propionic bacteria are stored for 1 year at +4 EC

they experience a loss in concentration [of viable bacteria] of less than 1 power of 10.

Experience has shown that capsules or gelcaps (which may or may not be gastroresistant) represent a form of administration which is advantageous.

According to another feature of the invention, each individual fraction contains a large number of bacteria, preferably more than $10^{(exp)9}$ bacteria.

Various experiments (summarized hereinbelow) have permitted verification of the particular aptitude of various strains of propionic bacteria for producing NO in the course of being cultured; this [verification] was first indirect via measurement of nitrite ions (NO₂), and then direct by mass spectrometric analysis in an anaerobic environment.

During the course of these experiments, during a first phase there was studied the concentration of nitrites in media rich in arginine and having very low concentrations of nitrates (50 micromolar), and it was reported that arginine is not a determining factor in determining the production of NO observed.

During a second phase [of the research], experiments were carried out with media which were supplemented with nitrates. The results showed that the nitrate character depends on the production of nitric oxide. [Translator's note: sic.]

1. Preliminary comparative tests:

Various strains of bacteria (yogurt inoculum, bifidobacteria, and lactobacillus) were cultivated in the presence of reconstituted milk (100 mL) supplemented by a yeast extract (10 g/L), followed by incubation at 37 EC.

The accumulation of the nitrite was measured over time.

These preliminary tests were carried out under the following conditions:

- incubation 0, 4, 7, or 10 hours, at 37 EC;
- 3 repetitions;

-- Page 5 --

- dosage of the nitrites by the Bran-Luebbe system;

Due to the nature of the extracts to be analyzed, the samples were subjected to a purification process comprising double centrifugation (2 x 10 min, 4 EC, 15,000 rpm) followed by ultrafiltration through a Miniprep 10 cartridge (retention of

proteins of MW > 10 kD), and then partial purification by passage of the sample through Waters C18 resin (55-105 micron).

At an early stage this method was tested with standard nitrite samples (Fig. 1), and then with extracts of Lactobacillus culture incubated 7 hr to which there was added (or not) a known quantity of nitrite (Fig. 2).

Fig. 1 shows the colorimetric profile obtained in an automatic Bran Luebbe chain of analysis:

- (1) of a bifidobacteria culture medium after 10 hr incubation [(temperature not stated)];
- (2) of a standard nitrite solution;
- (3) of the same solution after ultrafiltration;
- (4) of the same solution [(2) supra], after ultrafiltration and passage through C18 resin.

Fig. 2 shows the colorimetric profile obtained in an automatic Bran Luebbe chain of analysis:

- (1) of a Lactobacillus culture after 10 hr incubation at 37 EC;
- (2)(3) of a standard solution containing 410 microgram nitrite per liter;
- (4)(5) of a culture medium of Lactobacillus after 10 hr incubation at 37 EC, to which there has been added a known quantity of nitrite to obtain a solution containing nitrite 820 microgram/L.

These samples were purified by centrifugation, ultrafiltration, and passage through C18 resin, under the conditions described supra.

In these tests, no accumulation of nitrite was detected from

-- Page 6 --

the yogurt inoculum, the bifidobacteria, or the Lactobacillus, at any of the incubation times (0, 4, 7, or 10 hr).

2. Demonstration of the accumulation of nitrite by cultures of propionic bacteria:

Preliminarily, the possible presence of nitrate or nitrite in the preparation of YEL medium was investigated, by colorimetric dosage (Boehringer kit [lit., "Boehringer"]). It was found that there was a non-negligible amount of nitrate in this medium (concentration on the order of 50-100 micromolar), which may be a result of the yeast extract used in producing that medium. However, it was verified that the YEL medium [used] was completely free of nitrite.

Cultures of propionic bacteria (1 g lyophilizate per 100 mL of YEL medium) were tested.

These tests were carried out under the following conditions:

- incubation at 30 EC, for 24, 48, or 72 hours;
- 3 repetitions, for the 24 hr incubation;
- termination of the incubation by boiling [sic];
- purification of the product by centrifugation and passage of the extract through C18 resin;
- [selective?] dosage of nitrites into the medium, for analysis in a Bran-Luebbe system.

The dosage of the nitrites accumulated by the propionic bacteria was carried out to establish the kinetics of accumulation of nitrites as a function of time of incubation of the bacteria in the YEL medium.

Fig. 3 represents the variations of the quantity of nitrite produced (units of microgram/100 mL culture) as a function of the time of incubation (hr) (square points \oplus); and also the variations of the turbidity (absorbance at $\lambda = 650$ nm), also as a function of time of incubation (circular points ∇).

-- Page 7 --

This Figure shows that the quantity of nitrite is maximum at 24 hr, then decreases significantly thereafter at 48 and 72 hr of incubation.

One may reasonably hypothesize that this decrease results from the reduction of nitrite to NO, N₂O, or other compounds, by nitrite reductase.

According to the invention, one can show that the accumulation of NO₂ [(nitrite)] depends on the species or strains of propionic bacteria employed.

This situation has been verified by the tests summarized below:

3. Demonstration and comparison of accumulation of nitrite in the culture medium, in the case of 9 strains and 4 different species of propionic bacteria:

In this test there were studied the strains P20, P23, 2408, 2410, 2500, and 2501 of the species *P. freudenreichii* and the strains TL221, TL223, and TL207 of the respective species *P. thoenii*, *P. acidopropionicii*, and *P. jensenii*.

It should be noted that the strains denominated "TL" (dairy technology) belong to INRA-LRTL, while the strain P23 (or ITG23) has been registered in the National Collection of Cultures of Microorganisms (CNCM), of the Pasteur Institute, under the number I-1804, with date Dec 18, 1996.

The different strains of propionic bacteria (1 g lyophilizate or 5 mL fresh culture) were cultivated in 100 mL of YEL mdium containing around 50 micromolar nitrate, under the following conditions:

- incubation 12, 24, 36, or 48 hr, at 30 EC;
- 3 repetitions;
- termination of incubation by boiling;
- purification of the product by centrifugation and passage of the extract through C18 resin;
- accumulation of nitrite in the medium, measured by analysis in a Bran-Luebbe system;

-- Page 8 --

- estimation of the fermentation of each culture, measured by reading the absorbance at 650 nm.

The results obtained for each layer are presented together in Fig. 4:

In each case there are shown the variations in accumulation of nitrite (square points ⊕) and the turbidity of the culture medium (circular points ∇), as a function of the duration of incubation. Each value corresponds to the mean, ∇ the standard deviation of the mean, for n = 3.

It might be noted that the scale of accumulation of nitrite is 25 times greater than in the case of strains P23 and TL233.

These results show that the bacterial growth estimated based on the development of turbidity in the culture medium is closely distributed, for all the strains studied, attaining 2 to 2.5 DO after 48 hr incubation -- except for strain TL221, for which the turbidity reaches only 0.6 DO after 2 days.

On the other hand, there are very significant differences in the accumulation of nitrite as a function of time.

Strains 2500, 2408, P20, 2501, 2410, TL207, and TL221 accumulate a relatively small amount of nitrite, the maximum (0.1 microgram nitrite (NO_2^-)/mL) being attained after 36, 12, 36, 12, 12, 24, and 24 hr incubation, respectively.

In contrast, much greater accumulation of nitrite was obtained with strains P23 and TL 223, with which a maximum 1.8 microgram NO_2^- /mL was accumulated after 36 and 24 hr incubation, respectively.

It should be noted that the strain of propionic bacteria analyzed in the second abovementioned test (Fig. 2) had an intermediate position, with maximum accumulation of NO_2^- being about 0.5 microgram/mL.

These tests thus allow one to conclude that there are significant differences between the amounts of nitrite which can be produced by different strains of propionic bacteria of four different species,

-- Page 9 --

these differences being independent from the mere growth of these strains.

These results have been confirmed by the study for each strain of the course of the nitrite concentration in the culture medium as a function of the turbidity of the medium (said turbidity serving as an approximation of the bacterial growth).

The results of the latter tests are presented in Fig. 5, in which each value corresponds to the mean, \forall the standard deviation of the mean, for $n = 3$.

The abovementioned tests are such as to have established that, among the strains studied, strain TL223 is the strongest accumulator of nitrites, [but] wherewith the nitrites disappear after 12 hr. Accordingly, this strain was retained for complementary tests involving direct measurement of the production of nitric oxide by mass spectrometric analysis in anaerobic medium.

4. Preliminary measurement of production of NO by the strain TL223, in a helium atmosphere:

In this test, the cultures were carried out in 10 mL tubes containing 5 mL YEL medium with about 5 micromolar nitrate and 0.25 mL fresh culture of TL223 strain.

The atmosphere of the tubes was immediately purged with a 100 second flow of helium (at 100 mL/min).

Then the accumulation of NO in the atmosphere of the tubes was

measured versus time, under the following conditions:

- incubation 24, 36, or 48 hr, at 30 EC;
- 4 repetitions;
- measurement of the accumulation of NO by mass spectrometric analysis;
- estimation of the fermentation of each culture, measured by reading the absorbance at 650 nm.

In a preliminary test, the gas purification system ("Roboprep G+") and mass spectrometer system

-- Page 10 --

(Twenty-Twenty) were calibrated with increasing amounts of nitric oxide.

This gas [(the standard NO)] was generated from NaNO₂ in the presence of a solution of KI and H₂SO₄.

The identification and quantification of the nitric oxide were accomplished via the mass (30 for ¹⁴N¹⁶O, and 31 for ¹⁵N¹⁶O and ¹⁴N¹⁷O). This identification was further confirmed by measuring the isotopic ratio, $31/30 = (^{15}\text{N}^{16}\text{O} + ^{14}\text{N}^{17}\text{O})/^{14}\text{N}^{16}\text{O}$. It should be noted that the theoretical isotopic ratio 31/30 for NO is 0.00367 in the absence of contamination by ¹⁷O.

The results of the preliminary test are presented in Fig. 6, where the left part (A) corresponds to the calibration curve of the mass spectrometer used for quantifying the nitric oxide, and the right part (B) corresponds to the measurement of the isotopic ratio 31/30.

The results of the test proper are presented in Fig. 7.

In particular, Fig. 7A represents the variations of accumulation of NO in the atmosphere of the tubes as a function of the turbidity of the medium, and Fig. 7B represents the variations of said accumulation as a function of the time of incubation.

The vertical and horizontal bars indicate the standard deviation of the mean for $n = 4$, when larger than the size of the symbol itself.

Comparison of Fig. 7B (which represents the turbidity of the culture medium under helium, versus time) with Fig. 4 (which represents the same plot in air) shows that the growth of strain TL223 is not significantly affected by an atmosphere consisting essentially of helium.

One can also demonstrate that the rate of accumulation of nitric oxide in the atmosphere is constant during approximately the

first 45 hr of incubation, then changes ("deflects") (Fig. 7B); this

-- Page 11 --

corresponds to a turbidity of nearly 1.5 DO (Fig. 7A).

After about 65 hr incubation (turbidity above 1.7 DO), about 1.5 microgram NO has been accumulated in the helium atmosphere per 1 mL culture medium.

The order of magnitude obtained is commensurate ("compatible") with the nitrite content measured in the medium for the cultures in contact with air. In this latter case, one can essentially say (Fig. 5) that the strain TL223 accumulates a maximum 1.8 microgram NO_2^-/mL for turbidity 1.5 DO, which corresponds to c. 1.2 microgram NO/mL.

- - -

From this direct preliminary measurement of production of NO by strain TL223, one has sought, according to the invention [sic], to confirm the route of synthesis of the nitric oxide; in this connection, one would like to investigate whether this [synthesis] is stimulated by addition of nitrite or nitrate.

Such a stimulation can be verified by the tests summarized hereinbelow:

5. Study of stimulation of production of NO by addition of nitrate or nitrite:

With the aim of investigating whether it is possible to stimulate production of NO by propionic bacteria by [adding] NO_2^- or NO_3^- , a study was conducted of whether an increase in the production of NO by the strain TL223 is observed when 1 millimolar KNO_2 or KNO_3 is present (with and without isotopic tagging by ^{15}N).

This study was carried out under the following conditions:

- the strain TL223 was inoculated at 1% into a YEL medium (control) and a YEL medium with addition of 1 millimolar KNO_2 , 1 millimolar KNO_3 , or K^{15}NO_3 with 50% tagging with ^{15}N ;
- incubation 24, 48, and 72 hr at 30 EC;

- 3 repetitions per point and per treatment;
- accumulation of NO and determination of the isotopic ratio by mass spectrometry;
- estimation of the fermentation of each culture (via the turbidity), measured as absorbance at 650 nm;
- dosing with nitrate and nitrite after recovery of the bacterial media, centrifugation, and measuring using a Boehringer kit ("Boehringer").

Analysis was also performed of the accumulation of NO as a function of the concentration of NO_3^- (100, 150, 350, 650, and 1050 micromolar) or of NO_2^- (50, 100, 400, 800, and 1000 micromolar) after an incubation of 72 hr at 30 EC (TL223 inoculated at 1% into a YEL medium).

The samples to be analyzed were distributed in analysis tubes for NO from which the atmosphere was immediately purged by a flow of helium (helium purge) for 150 seconds, to obtain strictly [sic] anaerobic conditions.

The effect of the purging with helium on eventual detection of the NO by the mass spectrometer was tested with a sterile YEL medium, preliminarily purged with helium and incubated 72 hr at 30 EC. After 0, 24, 48, and 72 hr incubation (3 repetitions), no production of NO was detected, and the turbidity values continued to be zero.

Thus verification was obtained of the quality [sic] of the helium purging, the absence of any bacterial contamination, and the absence of interaction between the helium purging and the measurement of NO by the mass spectrometry.

The abovementioned tests produced the results indicated in Fig. 8, relating to the kinetics of accumulation of NO in the presence of nitrite or nitrate.

In particular:

- Fig. 8A shows variations of the accumulation of NO as a function of time;

- Fig. 8B shows variations of the turbidity as a function of time;

- Fig. 8C shows variations of the isotopic ratio (mass 31/masses 30 + 31) as a function of time; and

- Fig. 8D shows variations of the production of NO as a function

of the turbidity.

Each of these Figures concerns strain TL223 cultivated in:

- YEL medium alone;
- YEL medium in the presence of 1 millimolar nitrate ($^{15}\text{NO}_3^-$ tagged to the extent of 50%, and $^{14}\text{NO}_3^-$) [i.e. 50% $^{15}\text{NO}_3^-$ and 50% $^{14}\text{NO}_3^-$]; and
- YEL medium in the presence of 1 millimolar nitrite.

The vertical bars represent \forall the standard deviation of the mean for $n = 3$, when the deviation is larger than the size of the symbol itself.

These Figures demonstrate that the accumulation of NO with TL223 cultivated in the presence of 1 millimolar KNO_3 (with and without nitrogen 15 tagging) and in the presence of 1 millimolar KNO_2 is close to 7 microgram NO/mL after 48 hr incubation at 30 EC.

This value is 3.5 times greater than the production of NO in the case of YEL medium not supplemented with nitrate or nitrite (Fig. 8A). These differences are not due to differences in [bacterial] growth engendered by the composition of the medium, because the turbidity at the end of the growth process is of the same order of magnitude with the YEL medium alone (4.5 DO units after 72 hr) and with the same medium with nitrate or nitrite added (c. 5 DO units after 72 hr (Figs. 8B and 8D).

Fig. 8C shows that the addition of K^{15}NO_3 (50% tagging) allows one to obtain tagged NO in the proportion of c. 40% after 48 hr incubation; thus the mass 15 nitrogen added in the form of the nitrate is found in the NO synthesized by the strain TL223.

It was also observed that when the TL223 strain is cultivated in K^{15}NO_3 the profile of the peak of mass 31 ($^{15}\text{N}^{16}\text{O}$) increases very strongly with respect to the NO analyzed in a YEL medium containing un-tagged nitrate, which confirms this situation [(conversion of nitrate to NO as mediated by the bacteria and not some other phenomenon)].

Also, addition of 1 millimolar un-tagged KNO_3 or KNO_2 causes production of NO with an

-- Page 14 --

isotopic ratio of 0.75% (48 hr incubation -- Fig. 8C), which is very close to the natural isotopic ratio of NO (c. 0.4%).

These latter observations confirm very clearly that the gas analyzed in the mass spectrometry was indeed NO.

These tests thus have allowed one to conclude that the strain TL223 is capable of synthesizing NO directly from nitrite or in the presence of nitrate (after [i.e. through] reduction of the nitrate

to nitrite).

Based on the isotopic ratios obtained with YEL medium to which 1 millimolar $K^{15}NO_3$ (tagged 50% with ^{15}N) has been added, it is possible to deduce the proportion of conversion of nitrate to nitrite; thus, about 20% of the $K^{15}NO_3$ added is transformed to nitric oxide by the strain TL223.

The nitrate initially present in the sterile YEL medium explains the production of NO observed with TL223 (on the order of 2 microgram NO/mL after 72 hr incubation -- Fig. 7).

The variations of production of NO as a function of the concentration of nitrate or nitrite are shown in Fig. 9. In particular:

-- Fig. 9A shows variations of the production of NO and the course of the turbidity as a function of the initial concentration of nitrate, with TL223 cultivated in YEL medium, after 72 hr incubation;

-- Fig. 9B shows variations of the production of NO and the course of the turbidity as a function of the initial concentration of nitrite, with TL223 cultivated in YEL medium, after 72 hr incubation;

-- Fig. 9C shows variations of the proportion of conversion of nitrate to NO as a function of the initial concentration of nitrate; and

-- Fig. 9D shows variations of the proportion of conversion of nitrite to NO as a function of the initial concentration of nitrite.

-- Page 15 --

In these Figures, the concentrations of nitrate have been corrected to take into account the presence of c. 50 millimolar nitrate in the YEL medium itself, and are the following: 100, 150, 350, 550, 650, and 1050 millimolar.

The nitrite concentrations are the following: 50, 100, 400, 800, and 1000 millimolar.

These Figures show that for the selected ranges the production of nitric oxide by the strain TL223 is proportional to the initial concentration of nitrate (Fig. 9A) or nitrite (Fig. 9B) in the YEL medium. This relationship is linear.

In both cases, no "plateau" phase has been observed, which suggests that the concentrations of nitrate or nitrite used do not allow one to obtain the maximum level of accumulation of NO by [i.e. with the use of] the TL233 propionic bacteria.

It should also be noted that the presence of high concentrations of nitrate or nitrite does not affect the growth of the bacteria, as indicated by the fact that the turbidity values at 72 hr are very nearly equal for all the concentrations tested.

It is also noteworthy that the straight lines obtained in Figs. 9A and 9B are superposable, which enables one to demonstrate that the NO product comes directly from nitrite, or from nitrate via reduction of nitrate to nitrite.

In addition, these results show that with the strain TL223 the step of reduction of nitrate to nitrite is not the limiting step for the concentrations of nitrate chosen in these experiments.

It is also important to emphasize that the proportion of conversion of the NO_3^- (Fig. 9C) and the NO_2^- (Fig. 9D) evolves as a function of the quantity of substrate available, going from 20% to 60% when the concentration of NO_3^- or NO_2^- [sic] goes from 1000 micromolar to 100 micromolar.

This suggests that the production of NO is strongly regulated and that it has priority with respect to

-- Page 16 --

the use of nitric [sic] nitrogen for nitrogen syntheses.

Based on the above-presented conclusions, the production of NO in 12 strains of bacteria in two different species was studied. The results of these tests are summarized hereinbelow.

6. Study of production of NO in different strains of propionic [bacteria]:

In this test, the strains of propionic bacteria employed were the following:

P. freudenreichii: LS410, LS2501, LS2502, ITG 23, CNRZ89, CNRZ277, CNRZ81.

P. acidipropionici: TL223, NCD01072, PR75, CNRZ80, CNRZ86, CNRZ287.

It should be noted that the strains CNRZ80, CNRZ81, CNRZ86, CNRZ89, CNRZ277, and CNRZ287 belong to the public collection of INRA-CNRZ, and the strain NCD01072 belongs to the British collection, National Collection of Dairy Organisms. The other strains belong to private collections.

After inoculation of the YEL medium in the presence of 550 micromolar nitrate, the bacterial cultures were immediately divided into 5 mL portions in tubes which were sealed and purged with helium ([to produce] anaerobic conditions)]. Then the propionic strains

were subjected to the following experimental conditions:

- incubation 24, 48, and 72 hr at 30 EC;
- 3 repetitions;
- accumulation of NO in the atmosphere, and determination of the isotopic ratio by mass spectrometry;
- estimation of the fermentation of each culture, measured by reading the absorbance at 650 nm;
- dosing of nitrate and nitrite after recovery of the bacterial media, centrifugation, and measurement using a Boehringer kit [(Boehringer kit?)].

Fig. 10 represents the variations in accumulation of NO as a function of time for the strain TL223

-- Page 17 --

and the 12 other strains of propionic bacteria cultivated in the YEL medium in the presence of 550 micromolar nitrate. The strain TL223 is represented in each case for the purpose of comparison.

The vertical bars represent \forall the standard deviation of the mean for $n = 3$, when the deviation is larger than the size of the symbol itself.

This Figure shows the existence of strong divergences between the propionic strains.

Overall, in comparing the levels of production of NO after 72 hr incubation, one can classify the strains into 3 categories:

-- strains capable of producing 4-4.5 microgram NO/mL: TL223, CNRZ80, NCD01072, and PR75. The isotopic ratio for the NO produced by these strains is between 2 and 2.5% (for $t = 72$ hr);

-- strains capable of producing c. 2 microgram NO/mL: CNRZ81, CNRZ86, CNRZ89, CNRZ277, LS2502, and ITG23. The isotopic ratio for the NO produced by these strains is between 4 and 4.5% (for $t = 72$ hr);

-- strains capable of producing less than 1 microgram NO/mL: LS410, SL2501, and CNRZ287. Despite the presence of 550 microgram nitrate in the culture medium, these 3 strains produced only small amounts of NO, and the isotopic ratio was on the order of 10-13% ($t = 72$ hr). These values [of isotopic ratio] suggest that the peaks of masses 30 and 31 detected with these bacteria could not correspond to nitric oxide.

It should be noted that with the strains belonging to the first 2 categories, the [rate of] NO produced was not reduced at the end of the growth [(at the time the growth was terminated)], and thus that it [the NO] does not seem to have been re-utilized by the

propionic bacteria; thus there was accumulation of NO.

Fig. 11 represents the variations of the production of NO as a function of the turbidity, for the 13 strains of propionic bacteria mentioned above, cultivated in YEL medium in the presence of 550 micromolar nitrate.

-- Page 18 --

In each instance, the strain TL223 is shown for purposes of comparison.

The vertical bars represent \forall the standard deviation of the mean for $n = 3$, when the deviation is larger than the size of the symbol itself.

Fig. 12 represents the variations of the turbidity (DO at 650 nm) as a function of time, for the 13 strains of propionic bacteria analyzed, cultivated in YEL medium in the presence of 550 micromolar nitrate.

In each case the strain TL223 is represented, for comparison purposes.

The vertical bars represent \forall the standard deviation of the mean for $n = 3$, when the deviation is larger than the size of the symbol itself.

The strains which produce the most NO (TL223, CNRZ80, NCD01072, and PR75) achieve high turbidity values (4-5 DO units after 72 hr incubation).

Among these strains, it should be noted that the bacteria NCD01072 and PR75 grow more slowly than TL223 but are capable of very rapidly accumulating appreciable concentrations of NO.

Thus PR75 produces 2.8 microgram NO/mL for a turbidity of 0.5 DO units. The maximum production of NO occurred at turbidity c. 1.5 DO units for NCD01072 and PR75, whereas for TL223 the maximum occurred at 3.4 DO units.

To "refine" these results, an analysis was performed of the concentrations of NO, nitrate, and nitrite in the culture media in the 13 strains of propionic bacteria studied, as a function of incubation time.

The results obtained are presented in the Table below, in which the concentrations are expressed in μM . For each strain, the measurements were performed in a tube, after removal of the bacteria by centrifugation.

-- Page 19 --

[insert Table]

KEY to Table: (Concentrations are units of micromolar.)

h = hours.

Columns: (a) Concentration of NO₃; (b) Concentration of NO₂;
(c) Production of NO.

Rows: (d) *P. freudenreichii*; (e) *P. acidipropionici*.

- - -

This Table indicates the following:

-- The strains which produce 4 microgram NO/mL are capable of completely reducing the available nitrate (550 micromolar) after 24 hr incubation. They also are capable of completely reducing the nitrite obtained during the first 48 hr of incubation.

-- The strains LS410 and CNRZ287, which are very weak producers of NO, are not capable of significantly absorbing [sic -- i.e. converting] the nitrate present in the medium.

-- With the strains which bring about intermediate accumulation of NO, one can observe a course of the nitrate content and nitrite content which is very different, reflecting very different rates of

absorption of NO_3^- , and/or very different rates of reduction of NO_3^- and NO_2^- [(as between the different strains)]. Thus, strain CNRZ81 is capable of reducing all of the nitrate after 24 hr incubation. After 48 hours,

-- Page 20 --

CNRZ281 also reduces [essentially] all of the NO_2^- . In contrast, after 72 hr incubation CNRZ277 still had 246 micromolar NO_3^- and 85 micromolar NO_2^- .

- - -

The tests summarized above demonstrate that certain propionic bacteria are capable of reducing nitrate in a culture medium and thereby are capable of providing the nitrite needed for synthesizing NO.

It should be noted that the propionic strains which produce the most NO (TL223, CNRZ80, NCD01072, and PR75) all are of the species *P. acidipropionici* and all have nitrate reductase activity.

On the other hand, the strains which appear to produce less NO (or even no NO [sic]) (limit of detection of the mass spectrometer) (LS410, LS2501, and CNRZ287) are also bacteria which do not have any known nitrate reductase activity.

For certain propionic strains, it appears that the kinetics of production of NO is not directly linked to nitrate reductase activity.

Considering these results, the invention also relates to an absorbable dietetic or medicinal composition, characterized in that it is comprised of a preparation comprised of a substantial number of cells per gram, preferably more than $10(\text{exp})9$ cells/g, of strains of propionic bacteria selected based on their capacity to produce and/or accumulate nitric oxide in the amount of at least 1 microgram/mL of YEL [culture medium] containing 550 micromolar nitrate.

According to another feature of the invention, this composition contains propionic bacteria belonging to at least one the strains TL223, CNRZ80, CNRZ86, and NCD01072 of the species *P. acidipropionici*.

Among these strains, the strain TL223 has been found to be particularly advantageous.

It should also be noted that the strain [lit., "strains"] CNRZ80 is of particular interest from the standpoint of productivity, because it can accumulate a

-- Page 21 --

substantial concentration of NO in a short period of time (at relatively low turbidity values).

According to another feature of the invention, the described composition contains propionic bacteria belonging to at least one of the strains ITG23, CNRZ81, CNRZ89, CNRZ277, and LS2502 of the species *P. freudenreichii*.

It should be noted that, according to another feature of the invention, the composition can also contain other bacteria such as bifidiobacteria and/or lactic bacteria.

To supplement the results presented above, tests were carried out on two types of non-propionic bacteria, namely *E. coli* and *Lactobacillus farciminis*, which are known for their ability to reduce nitrites.

The results of these tests are summarized hereinbelow.

7. Study of the production of NO by strains of *E. coli* and *L. farciminis*:

These supplementary tests were carried out taking into account the publication of Gudrun Wolf, Elke K. Arendt, Ute Pfähler, and Walter P. Hammes, 1990, [(in English)] "Heme-dependent and heme-independent nitrite reduction by lactic acid bacteria results in different N-containing products", International Journal of Food Microbiology, 10, 323-330, which mentions that certain lactic bacteria ([e.g.] *L. farciminis*) are capable of producing nitric oxide from nitrite.

Preliminary experiments showed that after 5.5 hours of growth of the strain [of] *L. farciminis* in MRS [culture medium] to which 1 millimolar nitrate had been added, one no longer detected either nitrate or nitrite in the culture medium.

The same conclusion was arrived at concerning the strain [of] *E. coli* after 7.5 hr growth in BHI [culture medium] to which 1 millimolar nitrate had been added.

It is known that during growth the strain [of] *L. farciminis* acidifies MRS medium (c. pH 5 after 5-6 hours of culturing).

-- Page 22 --

Furthermore, the tests carried out in YEL medium indicate that nitrites are transformed into NO in acid medium.

These tests were carried out under the following experimental conditions:

- acidification of the YEL medium by HCl;
- addition of nitrite to a concentration of 400 micromolar;

- autoclaving of the media;
- three repetitions.

The results obtained are presented in Fig. 13, which shows, as a function of pH, the variations of production of NO after incubation 24 hr at 37 EC in YEL medium to which nitrites have been added.

This Figure is such as to demonstrate that substantial production of NO from nitrite occurs when the medium is acidified, with lower pH leading to greater production of NO.

Comparative tests were then carried out, of production of NO by *L. farciminis* and *E. coli* (which latter has the reputation of not producing NO) (Brittain, T., Blackmore, R., Greenwood, C., and Thomson, A.J., 1992, "Bacterial nitrite-reducing enzymes", Eur.J.Biol.Chem., 209, 793-802).

These tests were carried out under the following conditions:

- incubation in BHI medium (*E. coli*) or MRS medium (*L. farciminis*), at 37 EC;
- addition of nitrite to the medium, to a concentration of 1 millimolar;
- purging the atmosphere of each tube by helium, for 100 seconds;
- three repetitions;
- measurement of the turbidity at the end of the incubation.

These tests provided the results presented in Fig. 14.

In particular:

- Fig. 14A represents the variations of the production of NO as a function of incubation time; and

-- Page 23 --

- Fig. 14B represents the variations of the production of NO as a function of the turbidity of the medium.

It should be noted that the values obtained for production of NO are all clearly lower than the threshold of 1 microgram/mL which was deemed significant [in the discussion] above; as a result there is no accumulation of NO in the culture tubes.

These results thus indicate that the absence of nitrate and nitrite observed in the preliminary experiments after 5.5 hr (for *L. farciminis*) and after 7.5 hr (for *E. coli*) is not compensated for by accumulation of NO which may be of chemical origin (connected to acidification of the medium) or of bacterial origin.

In the case of the strain [of] *L. farciminis*, these results were confirmed by tests carried out on bacteria found in the form of

"resting cells" at pH regulated at 6.5 by a phosphate buffer containing lactate, under the following operating conditions:

- incubation at 37 EC;
- addition of nitrite to a concentration of 400 micromolar;
- purging the atmosphere of each tube by helium, for 100 seconds;
- three repetitions;
- measurement of the turbidity at the end of the incubation.

This analysis led to the following results, presented in Fig. 15:

-- Fig. 15A represents the variations in production of NO as a function of incubation time; and

-- Fig. 15B represents the variations in production of NO as a function of the turbidity.

These results confirmed those obtained previously, namely that the quantities of NO produced are too low to be significant, and thus the strain [of] *L. farciminis* is not capable of [significantly] accumulating nitric oxide. It is possible that this strain produces nitric oxide at the beginning of its growth, but that the NO produced is reused by the bacteria.

-- Page 24 --

Supplementary tests were carried out on strains TL223 and CNRZ80 in the form of "resting cells" after incubation at 30 EC and 37 EC.

8. Course of production of NO by propionic bacteria in the form of "resting cells":

This experiment was carried out under the following conditions:

- resting cells suspended in a phosphate buffer containing lactate, at pH 6.5;
- incubation at 30 EC and 37 EC;
- addition of nitrite to a concentration of 400 micromolar;
- purging the atmosphere of each tube by helium, for 100 seconds;
- three repetitions;
- measurement of the turbidity at the end of the incubation.

It should be noted that during the tests with incubation at 30 EC, in addition to the strains TL223 and CNRZ80, the strain CNRZ81 was tested, with a doubled bacterial concentration.

These experiments led to results presented in Fig. 16 and 17. In particular:

-- Fig. 16A represents the variations in production of NO for the resting cells at 30 EC as a function of incubation time;

-- Fig. 16B represents the variations in production of NO for the resting cells at 30 EC as a function of the turbidity of the medium;

-- Fig. 17A represents the variations in production of NO for the resting cells at 37 EC as a function of incubation time; and

-- Fig. 17B represents the variations in production of NO for the resting cells at 37 EC as a function of the turbidity of the medium.

These results indicate that the resting cells provide production of NO, not only in the case of the two strains of the species

-- Page 25 --

P. acidipropionici (TL223 and CNRZ80) but also in the case of the strain of the species *P. freudenreichii* (CNRZ81). The strain TL223 is the most productive.

Overall, at identical concentrations of the bacteria, the production of NO by the resting cells is of the same order of magnitude as that observed in the case of bacteria cultivated in YEL medium.

The production of NO by the resting cells occurs essentially during the first 5 hours of incubation. Beyond that period, production is low.

Thus, one may observe that at 37 EC the production of NO is identical to (TL223), or slightly greater than (CNRZ80), that obtained at 30 EC.

The advantages associated with ingestion of propionic bacteria have been verified by in vivo studies carried out on healthy humans.

9. Study of the effect of ingestion of propionic bacteria on intestinal transit, in healthy humans:

This study was performed in a hospital setting at CHU Caen, on a series of 19 healthy male volunteer subjects.

At the beginning of the test, each volunteer was administered 10 radioopaque markers daily, for 8 successive days, according to the protocol described in the publications

-- Arban, P., Devroede, G., Jehannin, B., et al., 1981
Dis.ColonRectum, 24, 625-9; and

-- Bouchoucha, M., Devroede, G., Arhan P., et al., 1992
Dis.ColonRectum, 35, 773-82.

According to this protocol, the transit study is carried out by following ingested radioopaque markers in various distinct spaces in

the abdominal cavity, on an abdominal [photographic] plate in a face view (anterioposterior). These spaces (right colon, left colon, and rectosigmoidal region), are defined by imaginary lines adjacent to the 5th lumbar vertebra, along the pelvic cavity. The time of transit is calculated according to the formula

$$T = (1/N) \cong n \cong -t ,$$

where

-- Page 26 --

N is the 10 markers;

n represents the number of markers counted in a region; and

-t is 24 hours.

- - -

The day following the described ingestion, i.e. on the 9th day [of the study], the volunteers were subjected to anterioposterior radiography of the abdomen, without preparation.

Beginning on the next day, i.e. the 10th day, each day for 2 weeks each volunteer was administered a capsule containing 5×10^{10} propionic bacteria from a culture collection used by the cheese industry, thus [deemed] completely benign to humans.

A second study on transit time similar to the first was performed during the second week of ingestion of the propionic bacteria, i.e. on the 17th to 26th day.

This study showed a significant increase in the transit time of the left colon (statistically $p < 0.05$ according to the Wilcoxon Matched-Pair Signed Ranks Test); the transit times of the right colon and the rectosigmoidal region were not significantly changed by ingestion of the propionic bacteria.

This study indicates that the ingestion of propionic bacteria affects intestinal motility; one may hypothesize that the results are connected to the synthesis of nitric oxide by the propionic bacteria.

##

Claims:

1. Use of propionic bacteria to obtain a current feeding composition or an absorbable dietetic or medicinal composition capable of releasing physiologically significant amounts of nitric oxide in a human or animal alimentary canal.
2. Use according to claim 1; characterized in that the composition is comprised of a dehydrated preparation.
3. Use according to claim 2; characterized in that the composition is present in the form of individual fractions containing a dose of bacteria which is intended to be regularly absorbed.
4. Use according to claim 3; characterized in that each individual fraction contains more than $10(\text{exp})9$ bacteria.
5. Use according to claim 1; characterized in that the composition is comprised of a liquid preparation, which may or may not be fermented.
6. Use according to claim 1; characterized in that the composition is a prepared preparation wherein the propionic bacteria are added to or incorporated into foodstuffs such as cheeses or food fibers.
7. An absorbable dietetic or medicinal composition; characterized in that it is comprised of a preparation which contains a substantial number, preferably greater than $10(\text{exp})9$, of cells per gram, of strains of propionic bacteria selected based on

-- Page 28 --

their capacity to produce and/or accumulate nitric oxide in the amount of at least 1 microgram/mL of YEL [(a certain culture medium)] containing 550 micromolar nitrate.

8. A composition according to claim 7; characterized in that it contains propionic bacteria belonging to at least one the strains TL223, CNRZ80, CNRZ86, and NCD01072 of the species *P. acidipropionici*.
9. A composition according to claim 8; characterized in that it contains propionic bacteria belonging to the strain TL223 of the species *P. acidipropionici*.

10. A composition according to claim 8; characterized in that it contains propionic bacteria belonging to the strain CNRZ80.

11. A composition according to claim 7; characterized in that it contains propionic bacteria belonging to at least one the strains ITG23, CNRZ81, CNRZ89, CNRZ277, and LS2502 of the species *P. freudenreichii*.

12. A composition according to one of claims 7 to 11; characterized in that it also contains other bacteria, such as bifidobacteria and/or lactic bacteria.

###

Figure legends:

[(insert the 17 Figures)]

Fig. 3. KEY:

Left ordinate: NO₂ [(nitrite)] produced
(microgram/100 mL culture).
Right ordinate: Turbidity (absorbance at $\lambda = 650$ nm).
Abscissa: Time of incubation (hours).
[(Solid line relates to left ordinate, and dashed line to
right ordinate.)]

Fig. 4. KEY:

Right ordinate: Turbidity (absorbance at $\lambda = 650$ nm).
Abscissa: Time of incubation (hours).
Souche = strain.

Fig. 5. KEY:

Abscissa: Turbidity (absorbance at $\lambda = 650$ nm).
Sche = strain.

Fig. 6. KEY:

Abscissa of left plot: Area of masses 30 and 31.
Right ordinate: Isotopic ratio 31/30.

Fig. 7. KEY:

DO = turbidity units.
Abscissa of bottom plot: Incubation time (hours).
Left ordinate: Microgram NO produced per mL of culture medium.

Fig. 8. KEY:

Abscissas A, B, and C: Incubation time (hours).
Abscissa D and ordinate B:
Turbidity (DO at $\lambda = 650$ nm).

Fig. 10. KEY:

Abscissa: Time of incubation (hours).

Fig. 12. KEY:

Ordinate: Turbidity (DO at $\lambda = 650$ nm).
Abscissa: Time of incubation (hours).

Figs. 14-17. KEY:

Durée d'incubation (heure) = Duration of incubation (hours).
Turbidité à 650 nm = Turbidity [(absorbance)] at 650 nm.

####

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : A61K 35/74, A23L 1/03, 1/308, A23C 19/032		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 98/27991
			(43) Date de publication internationale: 2 juillet 1998 (02.07.98)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR97/02399		(81) Etats désignés: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), brevet eurasiatique (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
(22) Date de dépôt international: 23 décembre 1997 (23.12.97)		Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i>	
(30) Données relatives à la priorité: 96/15977 24 décembre 1996 (24.12.96) FR 97/00885 28 janvier 1997 (28.01.97) FR			
(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): LABORA-TOIRES STANDA S.A. [FR/FR]; 68, rue Robert Kaskoreff, F-14050 Caen Cedex (FR).			
(72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): ROUSSEL, Edmond, Daniel [FR/FR]; 16, rue St. Loup, F-14210 Avenay (FR). LEGRAND, Charles, Gabriel [FR/FR]; Les Ombrages N°3, 14, avenue de Creully, F-14000 Caen (FR). LEGRAND, Marc, Henri [FR/FR]; 6, allée Beauséjour, Le Vendôme, F-14000 Caen (FR). ROLAND, Nathalie [FR/FR]; Bâtiment A, 62, rue Papu, F-35000 Rennes (FR).			
(74) Mandataire: CABINET HERRBURGER; 115, boulevard Haussmann, F-75008 Paris (FR).			
(54) Title: ABSORBABLE COMPOSITION CONTAINING PROPIONIC BACTERIA CAPABLE OF RELEASING NITRIC OXIDE IN THE HUMAN OR ANIMAL ALIMENTARY CANAL			
(54) Titre: COMPOSITION ABSORBABLE RENFERMANT DES BACTERIES PROPIONIQUES SUSCEPTIBLE DE DEGAGER DU MONOXYDE D'AZOTE DANS LE TUBE DIGESTIF HUMAIN OU ANIMAL			
(57) Abstract <p>The invention concerns the use of propionic bacteria for obtaining a current feeding composition or an absorbable dietetic or medicinal composition capable of releasing physiologically significant amounts of nitric oxide in the human or animal alimentary canal.</p>			
(57) Abrégé <p>Utilisation de bactéries propioniques pour l'obtention d'une composition d'alimentation courante ou d'une composition diététique ou médicamenteuse absorbable susceptible de dégager des quantités physiologiquement significatives de monoxyde d'azote dans le tube digestif humain ou animal.</p>			

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

« Composition absorbable renfermant des bactéries propioniques susceptible de dégager du monoxyde d'azote dans le tube digestif humain ou animal »

La présente invention concerne une composition d'alimentation courante ou une composition diététique ou médicamenteuse absorbable renfermant des bactéries propioniques susceptibles de dégager des quantités physiologiquement significatives de monoxyde d'azote dans le tube digestif humain ou animal.

Pendant de nombreuses décennies, on a totalement ignoré que le monoxyde d'azote constitue l'un des éléments nécessaires à la vie et à son maintien ; par suite jusqu'à ces quatre ou cinq dernières années, les chercheurs ne se sont pas penchés sur les bienfaits associés à la présence de cet oxyde, que ce soit en médecine, en nutrition ou en physiologie.

Ce n'est que tout dernièrement que l'on a attribué au monoxyde d'azote un nombre impressionnant de fonctions physiologiques et que l'on a émis l'hypothèse que ce gaz pouvait être impliqué au premier chef dans des fonctions aussi diverses que le contrôle de la pression artérielle, la fonction cytotoxique non spécifique des macrophages, l'agrégation plaquettaire et la neurotransmission ou encore le contrôle de la motricité du tube digestif.

A partir de cette supposition, les recherches portant sur le monoxyde d'azote se sont multipliées et l'importance de ce gaz a pu être confirmée.

Il est connu que le monoxyde d'azote, qui est un gaz très instable (demi-vie inférieure à 5 secondes dans les systèmes biologiques), est produit par biosynthèse au sein de l'organisme humain ou animal à partir de la L-arginine par un groupe d'enzymes dénommées NO-synthases (NOS) dont il existe deux types principaux, à savoir d'une part les NOS constitutives qui sont exprimées notamment dans les cellules endothéliales, les plaquettes sanguines et les neurones et, d'autre part, les NOS inductibles qui sont exprimées principalement par certaines cellules du système immunitaire (macrophages et

polynucléaires notamment) par le muscle lisse vasculaire et les cellules endothéliales.

Il est à noter que la production de NO par les NOS inductibles est, de plusieurs ordres de grandeurs, supérieure à la production de NO par les NOS constitutives, mais que dans tous les cas, cette production demeure relativement faible.

Or, et compte tenu du rôle bénéfique susmentionné du monoxyde d'azote, il serait souhaitable de pouvoir augmenter cette production en particulier en utilisant la voie naturelle du métabolisme alimentaire.

On n'a cependant jusqu'à présent jamais proposé de moyens permettant de parvenir à ce résultat.

L'objet de l'invention est de combler cette lacune.

Conformément à l'invention, on a pu parvenir au but recherché en constatant que, de manière surprenante, un type particulier de bactéries, les bactéries propioniques, sont susceptibles de produire du monoxyde d'azote, et que parmi ces bactéries, certaines espèces et certaines souches parmi ces espèces en produisent de grandes quantités.

Il s'agit là de bactéries propioniques qui, bien que n'appartenant pas au groupe des bactéries lactiques ou bifidobactéries classiquement introduites dans l'organisme par le biais de desserts lactés ou autres produits laitiers fermentés, sont néanmoins présentes en alimentation humaine depuis des siècles : ce sont en effet elles qui permettent l'obtention des trous lors de la fabrication du fromage dénommé « emmental » qui en fin d'affinage renferme environ 10^9 cellules/g de bactéries propioniques.

Il est à noter que la fermentation de ces bactéries produit entre autre de l'acide propionique, de l'acide acétique et du dioxyde de carbone.

La constatation susmentionnée est d'autant plus surprenante que l'on a pu vérifier que des bactéries lactiques, des bifidobactéries et/ou des levures, utilisées couramment dans le domaine agro-alimentaire, ne produisent pas de monoxyde d'azote.

L'invention se rapporte, en conséquence, à l'utilisation de bactéries propioniques pour l'obtention d'une composition d'alimentation courante ou d'une composition diététique ou médicamenteuse absorbable susceptible de
5 dégager des quantités physiologiquement significatives de monoxyde d'azote dans le tube digestif humain ou animal.

Conformément à l'invention, cette composition peut être constituée par une préparation élaborée et/ou présentée sous forme liquide (en particulier d'un liquide fermenté), sous forme déshydratée ou d'humidité intermédiaire.
10

Plus précisément, il est à noter que, sans pour cela sortir du cadre de l'invention, la composition peut se présenter :

- soit sous forme d'une préparation spécifique se justifiant
15 par sa seule finalité physiologique, à savoir l'ingestion de bactéries propioniques susceptibles de dégager des quantités physiologiquement significatives de monoxyde d'azote,
- soit sous forme d'une préparation alimentaire élaborée ayant parallèlement une finalité autre plus strictement
20 énergétique ou fonctionnelle ; dans ce dernier cas, les bactéries propioniques peuvent être ajoutées ou incorporées dans les aliments eux-mêmes notamment dans des fromages, dans des fibres alimentaires telles que des flocons de céréales, ou encore dans des laits fermentés, crèmes deserts, gâteaux et/ou boissons bienfaisantes, etc..
25

Conformément à l'invention, les bactéries propioniques peuvent être introduites sous forme de biomasse ou sous la forme d'un levain susceptible de se multiplier in situ.

30 Lorsqu'elle est déshydratée, la composition se présente, avantageusement, sous forme de fractions individuelles renfermant la dose de bactéries devant être absorbée régulièrement.

Ces fractions peuvent être ingérées directement
35 ou être préalablement diluées dans un liquide ; elles peuvent être conditionnées sous une forme permettant de faciliter l'absorption : comprimés, sachets de poudre granulée, liquide, ...

On a vérifié que de telles préparations déshydratées concentrées de bactéries propioniques conservées une année à +4°C voient leur concentration baisser de moins de un Log.

5 L'expérience a prouvé que des gélules gastrorésistantes ou non correspondent à un type de conditionnement particulièrement avantageux.

Selon une autre caractéristique de l'invention, chaque fraction individuelle renferme un grand nombre de bactéries, de préférence plus de 10^9 bactéries.

Diverses expérimentations (résumées ci-dessous) ont permis de vérifier l'aptitude toute particulière de différentes souches de bactéries propioniques à produire du NO au cours de leur culture, d'abord indirectement à partir de la mesure des ions nitrites NO₂ puis directement par analyse en spectrométrie de masse en milieu anaérobie.

Au cours de ces expérimentation, on a, dans un premier temps, étudié la concentration en nitrites dans des milieux riches en arginine et pauvres en nitrates (50 µM) et on s'est rendu compte que l'arginine n'est pas un élément déterminant dans la production de NO observée.

Dans un second temps, on a expérimenté des milieux supplémentés en nitrates. Les résultats obtenus dans ce dernier cas ont révélé le caractère nitrate dépendant de la production de monoxyde d'azote.

1 - Essais préliminaires comparatifs

Différentes souches bactériennes (inoculum yaourt, bifidobactéries, lactobacillus) ont été cultivées en présence d'un milieu lait reconstitué (100 ml) supplémenté par un extrait de levures (10 g/l) puis incubées à 37°C.

L'accumulation de nitrite a été mesurée au cours du temps.

Ces essais préliminaires ont été réalisés dans les conditions suivantes :

- incubation à 37°C pendant 0, 4, 7 ou 10 heures,
- 3 répétitions,

- dosage des nitrites par système Bran-Luebbe.

En raison de la nature des extraits à analyser, une étape de purification des échantillons a été successivement mise en oeuvre par une double centrifugation (2 x 10 min., 4°C, 15 000 rpm), suivie d'une ultrafiltration sur cartouche miniprep 10 (rétention des protéines de PM > 10kD) puis d'une purification partielle par passage de l'échantillon sur résine Waters C18 (55-105 µm).

Cette méthode a, dans un premier temps, été testée sur des échantillons étalons de nitrite (Figure 1), puis sur des extraits de culture de *Lactobacillus* incubés 7 heures auxquels a été ajoutée ou non une quantité connue de nitrite (Figure 2).

La figure 1 représente les profils colorimétriques obtenus sur une chaîne d'analyse automatique Bran Luebbe :

- (1) d'un milieu de culture de bifidobactéries après 10 heures d'incubation,
- (2) d'une solution standard de nitrite,
- (3) de cette même solution ultrafiltrée,
- (4) de cette même solution ultrafiltrée et passée sur résine C18.

La figure 2 représente les profils colorimétriques obtenus sur une chaîne d'analyse automatique Bran Luebbe :

- (1) d'un milieu de culture de *Lactobacillus* après 10 heures d'incubation à 37°C,
- (2) (3) d'une solution standard contenant 410 µg de nitrite/l,
- (4) (5) d'un milieu de culture de *Lactobacillus* après 10 heures d'incubation à 37°C auxquels a été ajoutée une quantité connue de nitrite afin d'obtenir une solution à 820 µg/l de nitrite.

Ces échantillons ont été purifiés par centrifugation ultrafiltration et passage sur résine C18 dans les conditions décrites précédemment.

Conformément à ces essais, aucune accumulation de nitrite n'a pu être détectée que ce soit à partir

d'inoculum de yaourt, de bifidobactéries ou de *Lactobacillus*, ce quel que soit le temps d'incubation (0, 4, 7 ou 10 heures).

5 2 - Mise en évidence de l'accumulation de nitrite par des cultures de bactéries propioniques

On a préalablement recherché la présence éventuelle de nitrate ou de nitrite dans la préparation du milieu YEL par dosage colorimétrique (kit Boehringer) :
10 on a ainsi pu mettre en évidence la présence d'une quantité non négligeable de nitrate dans ce milieu (concentration de l'ordre de 50 à 100 μ M) qui pourrait provenir de l'extrait de levure utilisé pour la fabrication de ce milieu ; en revanche, on a vérifié que le milieu YEL était totalement exempt de nitrite.
15

Des cultures de bactéries propioniques (1 g de lyophilisat pour 100 ml de milieu YEL) ont été testées.

Ces essais ont été mis en oeuvre dans les conditions suivantes :

- 20 • incubation à 30°C pendant 24, 48 ou 72 heures,
 • 3 répétitions pour l'incubation de 24 heures,
 • arrêt de l'incubation par ébullition,
 • purification du produit par centrifugation et passage de l'extrait sur résine C18,
25 • dosage des nitrites dans le milieu par analyse sur système Bran-Luebbe.

On a dosé les nitrites accumulés par les bactéries propioniques afin d'établir une cinétique d'accumulation des nitrites en fonction du temps d'incubation des bactéries sur milieu YEL.
30

La figure 3 représente, d'une part, les variations de la quantité de nitrite produite (en μ g/100 ml de culture) en fonction du temps d'incubation (en heures) (\square) et d'autre part les variations de la turbidité (absorbance à $\lambda = 650$ nm) également en fonction du temps d'incubation (O).
35

Cette figure montre que la quantité de nitrite est maximale à 24 heures puis diminue ensuite de façon significative après 48 et 72 heures d'incubation.

On peut raisonnablement penser que cette chute résulte de la réduction du nitrite en NO, N₂O ou autres composés par la nitrite réductase.

Conformément à l'invention, on a pu prouver que l'accumulation de NO₂ dépend des espèces ou souches de bactéries propioniques mises en oeuvre.

Cette situation a été vérifiée par les essais résumés ci-dessous :

3 - Mise en évidence et comparaison des accumulations de nitrite dans le milieu de culture dans le cas de 9 souches de 4 espèces différentes de bactéries propioniques

Conformément à cet essai, on a étudié les souches P20, P23, 2408, 2410, 2500 et 2501 de l'espèce *P.freudenreichii* et les souches TL221, TL223 et TL207 appartenant respectivement aux espèces *P.thoenii*, *P.acidipropionici* et *P.jensenii*.

Il est à noter que les souches TL (technologie laitière) sont des souches appartenant à l'INRA-LRTL, tandis que la souche P23 (ou ITG23) a été enregistrée à la Collection Nationale des Cultures de Micro-organismes (CNCM) de l'Institut Pasteur sous le numéro I-1804 en date du 18.12.96.

Les différentes souches de bactéries propioniques (1 g de lyophilisat ou 5 ml de culture fraîche) ont été cultivées sur 100 ml de milieu YEL contenant environ 50 µM de nitrate, selon les conditions suivantes :

- incubation à 30°C pendant 12, 24, 36 ou 48 heures,
- 3 répétitions,
- arrêt de l'incubation par ébullition,
- purification du produit par centrifugation et passage de l'extrait sur résine C18,
- accumulation de nitrite dans le milieu, mesurée par analyse sur système Bran-Luebbe,

- estimation de la fermentation de chaque culture mesurée par lecture de l'absorbance à 650 nm.

Les résultats obtenus pour chaque souche sont rassemblés sur la figure 4.

5 Celle-ci représente, dans chaque cas, les variations de l'accumulation de nitrite (\square) et de la turbidité du milieu de culture (O) en fonction de la durée d'incubation. Chaque valeur correspond à la moyenne \pm l'écart type de la moyenne pour $n = 3$.

10 Il convient de noter que les échelles d'accumulation du nitrite sont 25 fois plus grandes dans le cas des souches P23 et TL223.

Ces résultats prouvent que la croissance bactérienne, estimée d'après l'évolution de la turbidité du milieu de culture, est proche pour l'ensemble des souches étudiées, atteignant environ 2 à 2,5 DO après 48 heures d'incubation, à l'exception de la souche TL221 pour laquelle la turbidité n'atteint que 0,6 DO après 2 jours.

15 En revanche, il existe des différences hautement significatives quant à l'accumulation de nitrite en fonction du temps.

20 En effet, les souches 2500, 2408, P20, 2501, 2410, TL207 et TL221 accumulent une quantité relativement peu importante de nitrite, le maximum ($0,1 \mu\text{g}$ de NO_2^-/ml) étant atteint respectivement après 36, 12, 36, 12, 12, 24 et 24 heures d'incubation.

25 A l'opposé, une accumulation beaucoup plus forte de nitrite a été obtenue avec des souches P23 et TL223 qui accumulent, au maximum, $1,8 \mu\text{g}$ de NO_2^-/ml après, respectivement, 36 et 24 heures d'incubation.

30 Il est à noter que la souche de bactéries propioniques analysée dans le second essai susmentionné (figure 3) avait une position intermédiaire avec une accumulation maximale de NO_2^- , d'environ $0,5 \mu\text{g}/\text{ml}$.

35 Ces essais ont donc permis de constater qu'il existe des différences significatives entre les quantités de nitrite pouvant être produites par différentes souches de bactéries propioniques de quatre espèces différentes,

ces différences étant indépendantes de la croissance de ces souches.

Ces résultats ont pu être confirmés par l'étude pour chaque souche de l'évolution de la concentration en nitrite du milieu de culture en fonction de sa turbidité et donc approximativement de la croissance bactérienne.

Les résultats de ces derniers essais sont rapportés sur la figure 5 sur laquelle chaque valeur correspond à la moyenne \pm l'écart type de la moyenne pour $n = 3$.

Les essais susmentionnés ont été de nature à établir que, parmi les souches étudiées, la souche TL223 est la plus fortement accumulatrice de nitrites, ces nitrites disparaissant après 12 heures. Cette souche a donc été retenue dans le cadre d'essais complémentaires portant sur la mesure directe de la production de monoxyde d'azote par analyse en spectrométrie de masse en milieu anaérobie.

4 - Mesure préliminaire de la production de NO par la souche TL223 sous atmosphère d'hélium

Conformément à ces essais, les cultures ont été réalisées dans des tubes de 10 ml contenant 5 ml de milieu YEL contenant environ 50 μ M de nitrate et 0,25 ml de culture fraîche de la souche TL223.

L'atmosphère des tubes a été immédiatement évacuée par un flux d'hélium (100 ml/min.) pendant 100 secondes.

L'accumulation de NO dans l'atmosphère des tubes a ensuite été mesurée au cours du temps dans les conditions suivantes :

- incubation à 30°C pendant 24, 48 ou 72 heures,
- 4 répétitions,
- mesure de l'accumulation de NO par analyse en spectrométrie de masse,
- estimation de la fermentation de chaque culture mesurée par lecture de l'absorbance à 650 nm.

Lors d'un essai préliminaire, le système de purification de gaz (Roboprep G+) - spectromètre de masse

(Twenty-Twenty) a été calibré par des quantités croissantes de monoxyde d'azote.

Ce gaz a été généré à partir de NaNO_2 en présence d'une solution de KI et H_2SO_4 .

5 L'identification et la quantification du monoxyde d'azote ont été réalisées par sa masse : 30 pour $^{14}\text{N}^{16}\text{O}$ et 31 pour $^{15}\text{N}^{16}\text{O}$ et $^{14}\text{N}^{17}\text{O}$. Cette identification a ensuite été confirmée par la mesure du rapport isotopique : $31/30 = [^{15}\text{N}^{16}\text{O} + ^{14}\text{N}^{17}\text{O}] / ^{14}\text{N}^{16}\text{O}$. Il est à noter que le rapport isotopique théorique 31/30 du NO est de 0,00367 en l'absence de contamination par ^{17}O .

10 Les résultats de cet essai préliminaire sont rapportés sur la figure 6 sur laquelle la partie gauche (A) correspond à la courbe d'étalonnage du spectromètre de masse utilisé pour la quantification du monoxyde d'azote tandis que la partie droite (B) correspond à la mesure du rapport isotopique 31/30.

15 Les résultats proprement dits de cet essai sont rapportés sur la figure 7.

20 Plus précisément, la figure 7A représente les variations de l'accumulation de NO dans l'atmosphère des tubes en fonction de la turbidité du milieu tandis que la figure 7B représente les variations de cette accumulation en fonction du temps d'incubation.

25 Les barres verticales ou horizontales indiquent, lorsqu'elles sont plus larges que le symbole, l'écart type de la moyenne pour $n = 4$.

30 Une comparaison de la figure 7B (qui représente l'évolution au cours du temps de la turbidité du milieu de culture sous hélium) avec la figure 4 (qui représente cette même évolution à l'air) montre que la croissance de la souche TL223 n'est pas affectée significativement par une atmosphère constituée essentiellement d'hélium.

35 On a également pu établir que la vitesse d'accumulation du monoxyde d'azote dans l'atmosphère est constante durant environ les 45 premières heures d'incubation, puis s'infléchit ensuite (figure 7B), ce

qui correspond à une turbidité proche de 1,5 DO (figure 7A).

Après environ 65 heures d'incubation (turbidité supérieure à 1,7 DO), environ 1,5 µg de NO sont accumulés dans l'atmosphère d'hélium pour 1 ml du milieu de culture.

L'ordre de grandeur obtenu est compatible avec les teneurs en nitrite mesurées dans le milieu pour des cultures au contact de l'air.

Dans ce dernier cas, on avait en effet pu constater (figure 5) que la souche TL223 accumulait au maximum 1,8 µg de NO_2^- /ml pour une turbidité de 1,5 DO, ce qui correspond à environ 1,2 µg de NO/ml.

A partir de cette mesure directe préliminaire de la production de NO par la souche TL223, on a cherché, conformément à l'invention, à confirmer la voie de synthèse de ce monoxyde d'azote, et on a eu à cet effet l'idée de rechercher si celle-ci est stimulée par un apport de nitrite ou de nitrate.

Une telle stimulation a pu être vérifiée grâce aux essais résumés ci-dessous :

5 - Etude de la stimulation de la production de NO par apport de nitrite ou de nitrate

Dans le but de rechercher si la production de NO par les bactéries propioniques est possible à partir de NO_2^- ou de NO_3^- , on a recherché si l'on observe une augmentation de la production de NO par la souche TL223 lorsqu'elle est en présence de 1 mM de KNO_2 ou de KNO_3 (avec et sans marquage isotopique au ^{15}N).

Cette expérimentation a été effectuée dans les conditions suivantes :

- la souche TL223 a étéensemencée à 1 % dans un milieu YEL seul (témoin) ou avec addition de 1 mM de KNO_2 , de KNO_3 ou de K^{15}NO_3 avec un marquage isotopique à ^{15}N à 50%),
- incubation à 30°C pendant 24, 48 et 72 heures,

- 3 répétitions par point et par traitement,
- accumulation du NO et détermination du rapport isotopique par spectrométrie de masse,
- estimation de la fermentation de chaque culture (turbidité) mesurée par lecture de l'absorbance à 650 nm,
- dosage du nitrate et du nitrite après récupération des milieux bactériens, centrifugation et mesure par kit Boehringer.

On a également analysé l'accumulation de NO en fonction de la concentration en NO_3^- (100, 150, 350, 650 et 1050 μM) ou en NO_2^- (50, 100, 400, 800, 1000 μM) après une incubation de 72 heures à 30°C (TL223 ensemencée à 1 % dans un milieu YEL).

Les échantillons à analyser ont été distribués dans des tubes d'analyse de NO dont l'atmosphère a été immédiatement évacuée par un flux d'hélium (flush à l'hélium) pendant 150 s afin d'obtenir des conditions anaérobies strictes.

L'effet du flush à l'hélium sur une éventuelle détection de NO par le spectromètre de masse a été testé sur un milieu YEL stérile : ce milieu YEL, préalablement flushé à l'hélium, a été incubé à 30°C pendant 72 heures. Après 0, 24, 48 et 72 heures d'incubation (3 répétitions) on n'a détecté aucune production de NO et les valeurs de turbidité sont restées nulles.

On a ainsi pu vérifier la qualité du flush à l'hélium, l'absence de toute contamination bactérienne et l'absence d'interaction entre le flush à l'hélium et la mesure de NO par spectrométrie de masse.

Les essais susmentionnés ont permis d'obtenir les résultats rapportés sur la figure 8, en ce qui concerne la cinétique d'accumulation du NO en présence de nitrite ou de nitrate.

Plus précisément :

- la figure 8A représente les variations de l'accumulation de NO en fonction du temps,

- la figure 8B représente les variations de la turbidité en fonction du temps,
- la figure 8C représente les variations du rapport isotopique [masse 31/(masses 30+31)] en fonction du temps,
- 5 - la figure 8D représente les variations de la production de NO en fonction de la turbidité.

Chacune de ces figures concerne la souche TL223 cultivée sur un milieu YEL seul, en présence de 1 mM de nitrate ($^{15}\text{NO}_3^-$ - marqué à 50 % et $^{14}\text{NO}_3^-$) et en présence
10 de 1 mM de nitrite.

Les barres verticales représentent \pm l'écart type de la moyenne pour $n = 3$ lorsqu'elles sont plus grandes que le symbole.

Ces figures prouvent que l'accumulation de NO chez TL223 cultivé sur 1 mM de KNO_3 (marqué à l'azote 15 ou non marqué) ou sur 1 mM de KNO_2 est proche de 7 μg de NO/ml après 48 heures d'incubation à 30°C ; cette valeur est 3,5 fois supérieure à la production de NO dans le cas d'un milieu YEL non supplémenté en nitrate ou en nitrite
15 (figure 8A). Ces différences ne sont pas dues à des variations de croissance engendrées par la composition du milieu car la turbidité en fin de croissance, est du même ordre de grandeur sur un milieu YEL seul (4,5 unités DO après 72 heures) et sur un même milieu additionné en nitrate ou en nitrite (environ 5 unités DO après 72 heures
20 - figures 8B et 8D).

La figure 8C révèle que l'apport de K^{15}NO_3 marqué à 50 % permet d'obtenir du NO avec un marquage à environ 40 % après 48 heures d'incubation : l'azote de masse 15 apporté sous forme de nitrate est donc retrouvé dans le NO synthétisé par la souche TL223.
25

On a, en outre observé que lorsque la souche TL223 est cultivée sur K^{15}NO_3 , le profil du pic de masse 31 ($^{15}\text{N}^{16}\text{O}$) augmente très fortement par rapport au NO analysé sur un milieu YEL contenant du nitrate non marqué, ce qui permet de confirmer cette situation.
30

De plus, l'addition de 1 mM de KNO_3 ou de KNO_2 non marqué entraîne une production de NO avec un rapport

isotopique de 0,75 % (48 heures d'incubation - figure 8C), ce qui est très proche des valeurs du rapport isotopique naturel du NO (environ 0,4 %).

5 Ces dernières observations confirment de manière très claire que le gaz analysé en spectrométrie de masse était bien du NO.

10 Ces essais ont donc permis de constater que la souche TL223 est capable de synthétiser du NO directement à partir de nitrite ou en présence de nitrate après réduction de celui-ci en nitrite.

15 Sur la base des valeurs du rapport isotopique obtenues sur milieu YEL additionné de 1 mM de $K^{15}NO_3$ marqué à 50 %, il est possible de déduire le taux de conversion du nitrate en nitrite : ainsi, environ 20% du $K^{15}NO_3$ apporté est transformé en monoxyde d'azote par la souche TL223.

20 Le nitrate, initialement présent dans le milieu YEL stérile, explique la production de NO observée chez TL223 (de l'ordre de 2 μg de NO/ml après 72 heures d'incubation - figure 7).

Les variations de la production de NO en fonction de la concentration en nitrite ou en nitrate sont représentées sur la figure 9. Plus précisément :

- 25 - la figure 9A représente les variations de la production de NO et l'évolution de la turbidité en fonction de la concentration initiale en nitrate, chez la souche TL223 cultivée sur milieu YEL après 72 heures d'incubation,
- la figure 9B représente les variations de la production de NO et l'évolution de la turbidité en fonction de la concentration initiale en nitrite, chez la souche TL223 cultivée sur milieu YEL après 72 heures d'incubation,
- 30 - la figure 9C représente les variations du taux de conversion du nitrate en NO, en fonction de la concentration initiale en nitrate,
- 35 - la figure 9D représente les variations du taux de conversion du nitrite en NO, en fonction de la concentration initiale en nitrite.

Sur ces figures, les concentrations en nitrate ont été corrigées en tenant compte de la présence d'environ 50 μM de nitrate dans le milieu YEL seul et sont les suivantes : 100, 150, 350, 550, 650 et 1050 μM .

5 Les concentrations en nitrite sont les suivantes : 50, 100, 400, 800 et 1000 μM .

Ces figures montrent que pour les gammes choisies, la production de monoxyde d'azote par la souche TL223 est proportionnelle à la concentration initiale en nitrate (figure 9A) ou en nitrite (figure 9B) du milieu YEL. Cette relation est linéaire.

10 Dans les deux cas, aucune phase de plateau n'a été observée, ce qui laisse supposer que les concentrations en nitrate ou nitrite utilisées ne permettent pas d'obtenir le niveau maximum d'accumulation de NO par la bactérie propionique TL223.

15 Il est également à noter que la présence de fortes concentrations en nitrate ou en nitrite n'affecte pas la croissance bactérienne vu que les valeurs de turbidité à 72 heures sont très proches pour toutes les concentrations qui ont été testées.

20 Il convient, par ailleurs, de souligner que les droites obtenues sur les figures 9A et 9B sont superposables, ce qui permet de prouver que le NO produit provient directement du nitrite ou du nitrate via la réduction de celui-ci en nitrite.

25 De plus, ces résultats montrent que chez la souche TL223, l'étape de réduction du nitrate en nitrite n'est pas limitante pour les concentrations en nitrate choisies dans cette expérimentation.

30 Il est également important de souligner que le taux de conversion du NO_3^- (figure 9C) et du NO_2^- (figure 9D) évolue en fonction de la quantité de substrat disponible, passant de 20 à 60 % lorsque la concentration en NO_3^- ou NO_2^- passe de 1000 à 100 μM .

35 Ceci suggère que la production de NO est fortement régulée et qu'elle est prioritaire par rapport à

l'utilisation de l'azote nitrique pour les synthèses azotées.

A partir des conclusions susmentionnées, on a étudié la production de NO chez 12 souches de bactéries propioniques de deux espèces différentes. Les résultats de ces essais sont résumés ci-dessous :

6 - Etude de la production de NO chez différentes souches propioniques

Conformément à cet essai, les souches de bactéries propioniques retenues ont été les suivantes :

P.freudenreichii : LS410, LS2501, LS2502, ITG 23, CNRZ89, CNRZ277, CNRZ81.

P.acidipropionici : TL223, NCD01072, PR75, CNRZ80, CNRZ86, CNRZ287.

Il est à noter que les souches CNRZ80, CNRZ81, CNRZ86, CNRZ89, CNRZ277 et CNRZ287 appartiennent à la collection publique INRA-CNRZ tandis que la souche NCD01072 appartient à la collection britannique National Collection of Dairy Organisms ; les autres souches appartiennent quant à elles à des collections privées.

Après ensemencement sur milieu YEL en présence de 550 μ M de nitrate, les cultures bactériennes ont immédiatement été réparties par 5 ml dans des tubes étanches et flushées à l'hélium (conditions anaérobies). Ensuite, les souches propioniques ont été soumises aux conditions expérimentales suivantes :

- incubation à 30°C pendant 24, 48 et 72 heures,
- 3 répétitions,
- accumulation du NO dans l'atmosphère et détermination du rapport isotopique par spectrométrie de masse,
- estimation de la fermentation de chaque culture mesurée par lecture de l'absorbance à 650 nm,
- dosage du nitrate et du nitrite après récupération des milieux bactériens, centrifugation et mesure par kit Boehringer.

La figure 10 représente les variations de l'accumulation de NO en fonction du temps chez la souche

TL223 et les 12 autres souches de bactéries propioniques, cultivées sur un milieu YEL en présence de 550 μM de nitrate. La souche TL223 a été représentée dans chaque cas dans un but de comparaison.

5 Les barres verticales représentent \pm l'écart type de la moyenne pour $n=3$ lorsqu'elles sont plus grandes que le symbole.

Cette figure montre l'existence de fortes divergences entre les souches propioniques.

10 De manière globale, en comparant les niveaux de production de NO après 72 heures d'incubation, on peut classer les souches en trois catégories :

- souches capables de produire de 4 à 4,5 μg NO/ml : TL223, CNRZ80, NCDO1072 et PR75. Le rapport isotopique du NO produit par ces souches est compris entre 2 et 2,5 % ($T=72$ h),
- 15 • souches capables de produire environ 2 μg NO/ml : CNRZ81, CNRZ86, CNRZ89, CNRZ277, LS2502, ITG23. Le rapport isotopique du NO produit par ces souches se situe entre 4 et 5,5 % ($T=72$ h),
- 20 • souches produisant moins de 1 μg NO/ml : LS410, LS2501 et CNRZ287. Malgré la présence de 550 μM de nitrate dans le milieu de culture, ces 3 souches n'ont produit que de très faibles quantités de NO et le rapport isotopique était de l'ordre de 10 à 13 % ($T=72$ h). Ces valeurs suggèrent que les pics de masses 30 et 31 détectés chez ces bactéries pourraient ne pas correspondre à du monoxyde d'azote.

25 Il est à noter que chez les souches appartenant aux deux premières catégories, le NO produit ne diminue pas en fin de croissance et qu'il ne semble donc pas réutilisé par les bactéries propioniques : il y a donc accumulation du NO.

35 La figure 11 représente les variations de la production de NO en fonction de la turbidité chez les 13 souches de bactéries propioniques susmentionnées, cultivées sur milieu YEL en présence de 550 μM de nitrate.

la souche TL223 a été représentée dans chaque cas dans un but comparatif.

5 Les barres verticales représentent \pm l'écart type de la moyenne pour $n=3$, lorsqu'elles sont plus grandes que le symbole.

La figure 12 représente les variations de la turbidité (DO à 650 nm) en fonction du temps chez les 13 souches de bactéries propioniques analysées, cultivées sur milieu YEL en présence de 550 μ M de nitrate.

10 La souche TL223 est représentée, dans chaque cas, dans un but comparatif.

Les barres verticales représentent l'écart type de la moyenne pour $n=3$, lorsqu'elles sont plus grandes que le symbole.

15 Les souches produisant le plus de NO (TL223, CNRZ80, NCDO1072 et PR75) atteignent toutes des valeurs de turbidité élevées (4 à 5 unités DO après 72 heures d'incubation).

20 Parmi ces souches, il est à noter que les bactéries NCDO1072 et PR75 croissent moins vite que TL223, mais sont capables d'accumuler très rapidement de fortes concentrations en NO.

25 Ainsi, PR75 produit 2,8 μ g de NO/ml pour une turbidité de 0,5 unités DO. Le maximum de production de NO est enregistré pour des valeurs de turbidité d'environ 1,5 unité DO pour NCDO1072 et PR75, contre 3,4 unités DO pour TL223.

30 Pour « affiner » ces résultats, on a analysé l'évolution des concentrations en NO, nitrate et nitrite des milieux de culture des 13 souches de bactéries propioniques étudiées en fonction du temps d'incubation.

35 Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau ci-dessous dans lequel les concentrations sont exprimées en μ M. Pour chaque souche, les mesures ont été effectuées sur un tube, après élimination des bactéries par centrifugation.

	Concentration en NO_3^-			Concentration en NO_2^-			Production de NO		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h
<i>P. freudenreichii</i>									
LS410	674	638	596	0	5	22	13	18	23
LS2501	645	649	406	6	13	215	12	26	35
LS2502	338	0	0	176	122	16	12	53	72
ITG23	441	218	24	11	246	278	10	36	62
CNRZ89	595	160	42	16	171	154	10	38	74
CNRZ277	559	435	246	17	3	85	12	42	66
CNRZ81	0	0	0	400	12	0	26	66	71
<i>P. acidipropionici</i>									
TL223	0	0	0	271	0	0	71	149	152
NCDO1072	0	2	0	370	3	0	50	148	146
PR75	11	2	0	185	1	0	91	147	146
CNRZ80	0	0	0	146	0	0	93	136	140
CNRZ86	594	491	0	14	41	405	9	28	62
CNRZ287	624	570	646	0	0	5	9	20	29

Ce tableau permet de faire les constatations suivantes :

- 5 - les souches produisant 4 μg NO/ml sont capables de réduire entièrement le nitrate disponible (soit 550 μM) après 24 heures d'incubation. De plus, elles peuvent réduire totalement le nitrite obtenu au cours des 48 premières heures d'incubation
- 10 - les souches LS410 et CNRZ287, très faibles productrices de NO, ne sont pas capables d'absorber significativement le nitrate présent dans le milieu.
- chez les souches présentant une accumulation intermédiaire de NO, on peut observer des évolutions des teneurs en nitrate et en nitrite très différentes traduisant des vitesses d'absorption du NO_3^- et/ou de réduction du NO_3^- et du NO_2^- très différentes. Ainsi, la souche CNRZ81 est capable de réduire la totalité du nitrate après 24 heures d'incubation. Après 48 heures,
- 15

CNRZ81 réalise également la réduction de l'ensemble du NO_2^- obtenu par réduction du NO_3^- . A l'opposé, CNRZ277 possède encore 246 μM de NO_3^- et 85 μM de NO_2^- après 72 heures d'incubation.

5 Les essais résumés ci-dessus ont révélé que certaines souches propioniques sont capables de réduire le nitrate du milieu de culture et de fournir ainsi le nitrite nécessaire à la synthèse de NO.

10 Il est à noter que les souches propioniques qui produisent le plus de NO (TL223, CNRZ80, NCD01072 et PR75) appartiennent toutes à l'espèce *P.acidipropionici* et possèdent, en outre, toutes une activité nitrate réductase.

15 A l'inverse, les souches produisant apparemment moins, voire pas du tout, de NO (limite de détection du spectromètre de masse) sont également des bactéries qui ne possèdent pas d'activité nitrate réductase connue (LS410, LS2501 et CNRZ287).

20 Pour certaines souches propioniques, il semble que la cinétique de production de NO ne soit pas directement liée à l'activité nitrate réductase.

Compte tenu de ces résultats, l'invention se rapporte également à une composition diététique ou médicamenteuse absorbable, caractérisée en ce qu'elle est constituée par une préparation renfermant une quantité importante de préférence plus de 10^9 cellules/g, de souches de bactéries propioniques sélectionnées en fonction de leur capacité à dégager et/ou à accumuler du monoxyde d'azote à raison d'au moins 1 $\mu\text{g/ml}$ de milieu YEL contenant 550 μM de nitrate.

30 Selon une autre caractéristique de l'invention, cette composition renferme des bactéries propioniques appartenant à au moins l'une des souches TL223, CNRZ80, CNRZ86 et NCD01072 de l'espèce *P.acidipropionici*.

Parmi ces souches, la souche TL223 s'est révélée particulièrement avantageuse.

35 Il est également à noter que la souche CNRZ80 présente un intérêt tout particulier d'un point de vue « productivité » vu qu'elle est capable d'accumuler une con-

centration importante de NO, ce très rapidement (pour des valeurs de turbidité relativement faibles).

Selon une autre caractéristique de l'invention, cette composition renferme des bactéries propioniques appartenant à au moins l'une des souches ITG23, CNRZ81, CNRZ89, 5 CNRZ277 et LS2502 de l'espèce *P.freudenreichii*.

Il est à noter que, conformément à une autre caractéristique de l'invention, la composition peut également renfermer d'autres bactéries telles que des bifidobactéries 10 et/ou des bactéries lactiques.

Pour compléter les résultats obtenus ci-dessus, on a effectué des tests sur deux types de bactéries non propioniques : *E.coli* et *Lactobacillus farciminis* connues pour leur aptitude à réduire les nitrites.

15 Les résultats de ces tests sont résumés ci-dessous :

7 - Etude de la production de NO par les souches *E.coli* et *L.farciminis*

20 Ces tests complémentaires ont principalement été effectués compte tenu de l'existence de la publication « Heme-dependent and heme-independent nitrite reduction by lactic acid bacteria results in different N-containing products » Gudrun Wolf, Elke K. Arendt, Ute Pfähler and 25 Walter P. Hammes - International Journal of Food Microbiology, 10 (1990) 323-330 qui mentionne que certaines bactéries lactiques (*L.farciminis*) sont capables de produire du monoxyde d'azote à partir de nitrite.

Des expériences préliminaires ont montré qu'après 30 5 h 30 de croissance de la souche *L.farciminis* dans du MRS additionné de 1 mM de nitrate, on ne détectait plus de nitrate ni de nitrite dans le milieu de culture.

La même constatation a été faite en ce qui concerne la souche *E.coli* après 7 h 30 de croissance sur milieu 35 BHI additionné de 1 mM de nitrate.

Il est connu, qu'au cours de sa croissance, la souche *L.farciminis* acidifie le milieu MRS (environ pH 5 après 5-6 heures de culture).

Or, on a pu constater, à partir d'essais réalisés sur milieu YEL, que les nitrites se transforment en NO en milieu acide.

Ces essais ont été réalisés dans les conditions expérimentales suivantes :

- acidification du milieu YEL par de l'HCl,
- apport de nitrite à une concentration de 400 μ M,
- autoclavage des milieux,
- trois répétitions.

Les résultats obtenus sont rassemblés sur la figure 13 qui représente les variations en fonction du pH de la production de NO dans le milieu YEL additionné de nitrites après incubation à 37°C pendant 24 heures.

Cette figure est de nature à prouver qu'il existe une production notable de NO à partir du nitrite du milieu lorsque celui-ci est acide, cette production augmentant lorsque le pH diminue.

Par suite, on a effectué des tests comparatifs de la production de NO par *L.farciminis* et par *E.coli* qui est réputée non productrice de NO (Brittain T, Blackmore R, Greenwood C & Thomson AJ (1992) - Bacterial nitrite - reducing enzymes - Eur. J. Bio. Chem., 209, 793-802).

Ces tests ont été réalisés dans les conditions suivantes :

- incubation à 37°C sur milieu BHI (*E.coli*) ou MRS (*L.farciminis*),
- apport de nitrate dans le milieu à une concentration de 1 mM,
- flushage de l'atmosphère de chaque tube par de l'hélium pendant 100 secondes,
- trois répétitions,
- mesure de la turbidité en fin d'incubation.

Ces essais ont permis d'obtenir les résultats rapportés sur la figure 14.

Plus précisément :

- la figure 14A représente les variations de la production de NO en fonction du temps d'incubation,

- la figure 14B représente les variations de la production de NO en fonction de la turbidité du milieu.

Il est à noter que les valeurs obtenues pour la production de NO sont toutes nettement inférieures au seuil de 1 $\mu\text{g/ml}$ qui a été considéré ci-dessus comme significatif :
5 il en résulte qu'il n'y a pas accumulation de NO dans les tubes de culture.

Ces résultats indiquent donc que l'absence de nitrate et de nitrite observée dans l'expérience préliminaire
10 après respectivement 5 h 30 (*L.farciminis*) et 7 h 30 (*E.coli*) n'est pas compensée par une accumulation de NO qui pourrait être soit d'origine chimique (liée à l'acidification du milieu) soit d'origine bactérienne.

Ces résultats ont été, dans le cas de la souche
15 *L.farciminis*, confirmés par des tests effectués sur des bactéries se trouvant sous forme de resting cells à pH régulé à 6,5 par un tampon phosphate contenant du lactate dans les conditions opératoires suivantes :

- incubation à 37°C,
- 20 - apport de nitrite à une concentration de 400 μM ,
- flushage de l'atmosphère de chaque tube par de l'hélium pendant 100 secondes,
- trois répétitions,
- mesure de la turbidité en fin d'incubation.

25 Cette analyse a permis d'obtenir les résultats rapportés sur la figure 15 :

- la figure 15A représente les variations de la production de NO en fonction du temps d'incubation,
- la figure 15B représente les variations de la production de
30 NO en fonction de la turbidité.

Ces résultats confirment ceux obtenus précédemment, à savoir que les quantités de NO produites sont trop faibles pour être significatives et donc que la souche *L.farciminis* n'est pas susceptible d'accumuler le monoxyde
35 d'azote. Il est toutefois possible que cette souche produise du monoxyde d'azote en début de croissance, mais que le NO éventuellement produit soit réutilisé par la bactérie.

Des essais complémentaires ont été réalisés sur les souches TL223 et CNRZ80 sous forme de resting cells après incubation à 30 et également à 37°C.

5 8 - Evolution de la production de NO par des bactéries propioniques sous forme de resting cells

Cette expérimentation a été effectuée dans les conditions suivantes :

- 10 - resting cells suspendues dans un tampon phosphate contenant du lactate à pH 6,5,
- incubation à 30°C ou à 37°C,
- apport de nitrite à une concentration de 400 µM,
- flushage de l'atmosphère de chaque tube par de l'hélium pendant 100 secondes,
- 15 - trois répétitions,
- mesure de la turbidité en fin d'incubation.

Il est à noter que lors des tests relatifs à l'incubation à 30°C, on a examiné, outre les souches TL223 et CNRZ80, la souche CNRZ81 avec une concentration bactérienne
20 doublée.

Cette expérimentation a permis d'obtenir les résultats rapportés sur les figures 16 et 17. Plus précisément :

- 25 - la figure 16A représente les variations de la production de NO par des resting cells à 30°C en fonction de la durée d'incubation,
- la figure 16B représente les variations de la production de NO par des resting cells à 30°C en fonction de la turbidité du milieu,
- 30 - la figure 17A représente les variations de la production de NO par des resting cells à 37°C en fonction de la durée d'incubation,
- la figure 17B représente les variations de la production de NO par des resting cells à 37°C en fonction de la turbidité
35 du milieu.

Ces résultats sont de nature à prouver qu'il existe une production conséquente de NO par des resting cells non seulement dans le cas des deux souches de l'espèce

P.acidipropionici (TL223 et CNRZ80) mais également dans le cas de la souche de l'espèce *P.freundenreichii* (CNRZ81). La souche TL223 est la plus productive.

5 Globalement, à des concentrations identiques de bactéries, la production de NO par des resting cells est du même ordre que celle observée dans le cas de bactéries cultivées sur milieu YEL.

La production de NO par des resting cells intervient essentiellement lors des cinq premières heures d'incubation ; au-delà de cette période, la production est faible.

On a ainsi pu observer qu'à 37°C, la production de NO est identique (TL223) ou légèrement supérieure (CNRZ80) à celle obtenue à 30°C.

15 Les avantages associés à l'ingestion de bactéries propioniques ont, en outre, été vérifiés par des investigations réalisées in vivo chez l'homme sain.

9 - Etude de l'effet de l'ingestion de bactéries propioniques sur le transit intestinal chez l'homme sain

20 Cette étude a été réalisée en milieu hospitalier au CHU de Caen sur une série de 19 sujets masculins volontaires sains.

Au début de ce test, on a fait absorber quotiennement à chaque volontaire 10 marqueurs radio opaques, ce pendant 8 jours consécutifs, conformément au protocole décrit dans les publications Arhan P, Devroede G, Jehannin B et coll. *Dis Colon Rectum* 1981 ; 24:625-9. et Bouchouca M, Devroede G. Arhan P et coll. *Dis Colon Rectum* 1992 ; 35:773-82.

30 Selon ce protocole, l'étude du transit est effectuée par comptage des marqueurs radio opaques ingérés dans les différentes aires de la cavité abdominale répartis sur un cliché d'abdomen de face. Ces aires (côlon droit, côlon gauche et rectosigmoïde) sont définies par des lignes fictives joignant la 5^{ème} vertèbre lombaire au contour de la cavité pelvienne. Le temps de transit est calculé selon la formule $T = 1/N \cdot n \cdot \Delta t$; N étant

égal à 10 marqueurs, n représentant le nombre de marqueurs comptés dans une région et Δt étant égal à 24 heures.

5 Le jour suivant cette ingestion, c'est-à-dire le 9^{ième} jour, on a fait subir aux volontaires une radiographie de l'abdomen de face sans préparation.

10 A partir du jour suivant, c'est-à-dire du 10^{ième} jour, on a fait ingérer quotidiennement à chaque volontaire, ce pendant 2 semaines, une gélule contenant 5 10^{10} bactéries propioniques issues d'une banque de souches utilisées dans l'industrie fromagère, donc parfaitement inoffensives pour l'homme.

15 Une seconde étude du temps de transit similaire à la première a été effectuée durant la seconde semaine d'ingestion des propioniques, c'est-à-dire du 17^{ième} au 26^{ième} jour.

20 Cette étude a révélé un ralentissement significatif du temps de transit du côlon gauche ($p < 0,05$ conformément au test statistique Wilcoxon Matched-Paired Signed-Ranks Test.) ; les temps de transit du colon droit et du rectosigmoïde n'ont pas été significativement modifiés par l'ingestion des propioniques.

25 Cette étude a donc permis de prouver que l'ingestion de bactéries propioniques a une influence sur la motricité intestinale ; on peut supposer que ces résultats sont liés à la synthèse de monoxyde d'azote par les bactéries propioniques.

R E V E N D I C A T I O N S

- 1°) Utilisation de bactéries propioniques pour l'obtention d'une composition d'alimentation courante ou d'une composition diététique ou médicamenteuse absorbable susceptible de
5 dégager des quantités physiologiquement significatives de monoxyde d'azote dans le tube digestif humain ou animal.
- 2°) Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que
10 la composition est constituée par une préparation déshydratée.
- 3°) Utilisation selon la revendication 2, caractérisée en ce que
15 la composition se présente sous forme de fractions individuelles renfermant la dose de bactéries devant être absorbée régulièrement.
- 4°) Utilisation selon la revendication 3, caractérisée en ce que
20 chaque fraction individuelle renferme plus de 10^9 bactéries.
- 5°) Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que
25 la composition est constituée par une préparation liquide fermentée ou non.
- 6°) Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que
30 la composition est une préparation élaborée, les bactéries propioniques étant ajoutées ou incorporées dans des aliments tels que des fromages ou des fibres alimentaires.
- 7°) Composition diététique ou médicamenteuse absorbable, caractérisée en ce qu'
35 elle est constituée par une préparation renfermant une quantité importante de préférence plus de 10^9 cellules/g de souches de bactéries propioniques sélectionnées en fonction de

leur capacité à dégager et/ou à accumuler du monoxyde d'azote à raison d'au moins 1 $\mu\text{g/ml}$ de milieu YEL contenant 550 μM de nitrate.

- 5 8°) Composition selon la revendication 7,
caractérisée en ce qu'
elle renferme des bactéries propioniques appartenant à au
moins l'une des souches TL223, CNRZ80, CNRZ86 et NCDO1072 de
l'espèce *P.acidipropionici*.
- 10 9°) Composition selon la revendication 8,
caractérisée en ce qu'
elle renferme des bactéries propioniques appartenant à la
souche TL223 de l'espèce *P.acidipropionici*.
- 15 10°) Composition selon la revendication 8,
caractérisée en ce qu'
elle renferme des bactéries propioniques appartenant à la
souche CNRZ80.
- 20 11°) Composition selon la revendication 7,
caractérisée en ce qu'
elle renferme des bactéries propioniques appartenant à au
moins l'une des souches ITG23, CNRZ81, CNRZ89, CNRZ277 et
25 LS2502 de l'espèce *P.freudenreichii*.
- 12°) Composition selon l'une quelconque des revendications 7
à 11,
caractérisée en ce qu'
30 elle renferme en outre d'autres bactéries telles que des bi-
fidobactéries et/ou des bactéries lactiques

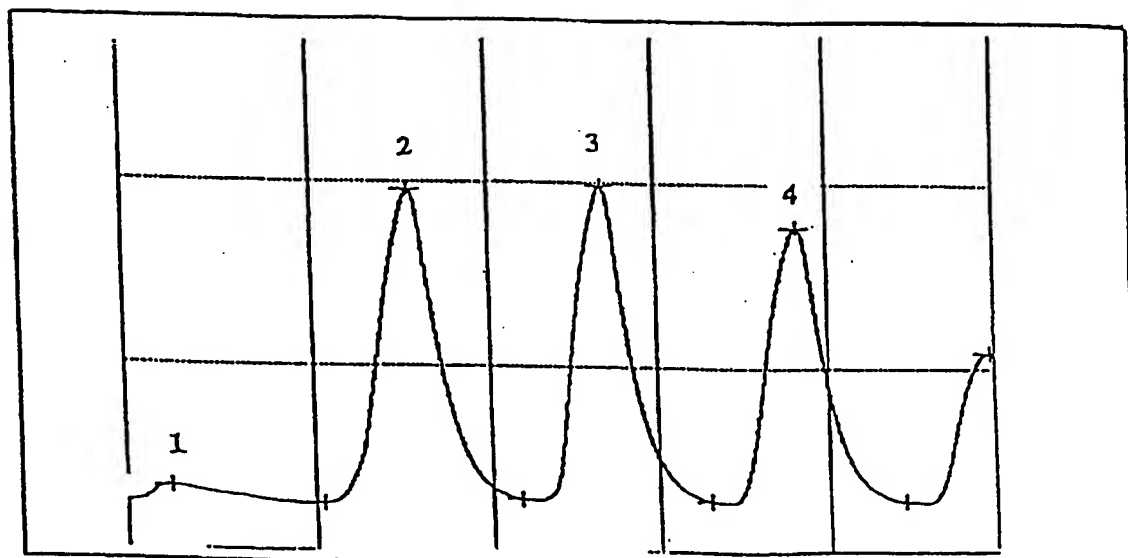


Figure 1

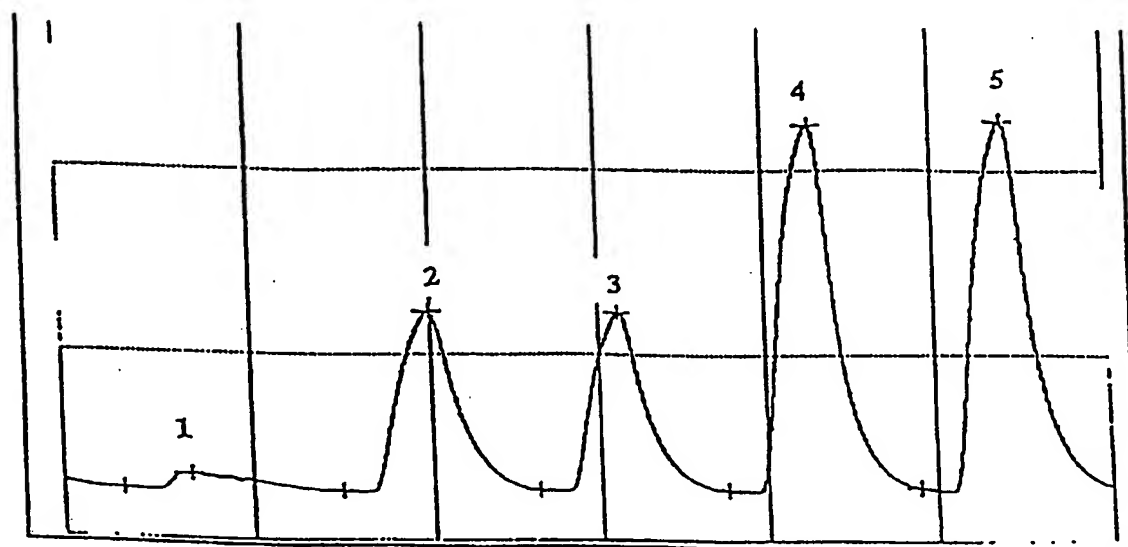


Figure 2

2/12

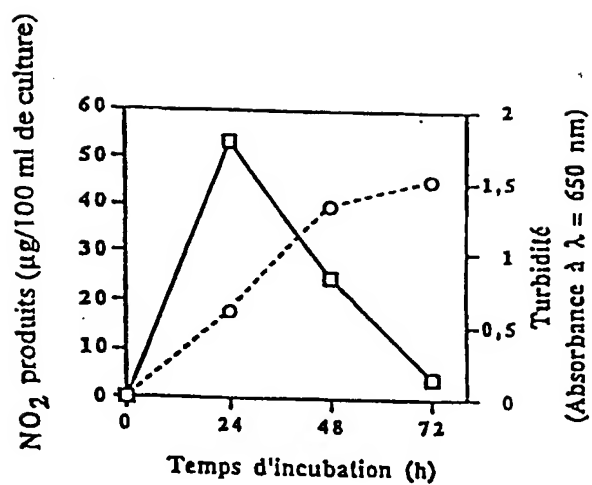


Figure 3

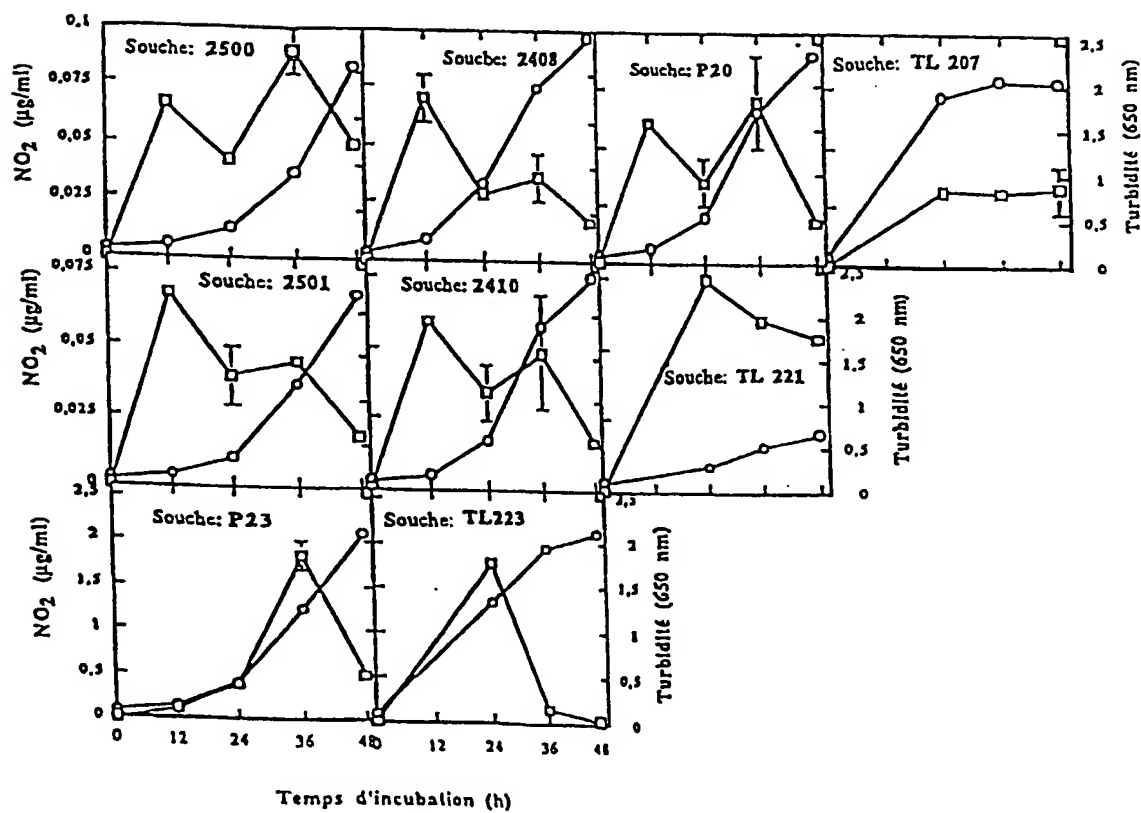


Figure 4

3/12

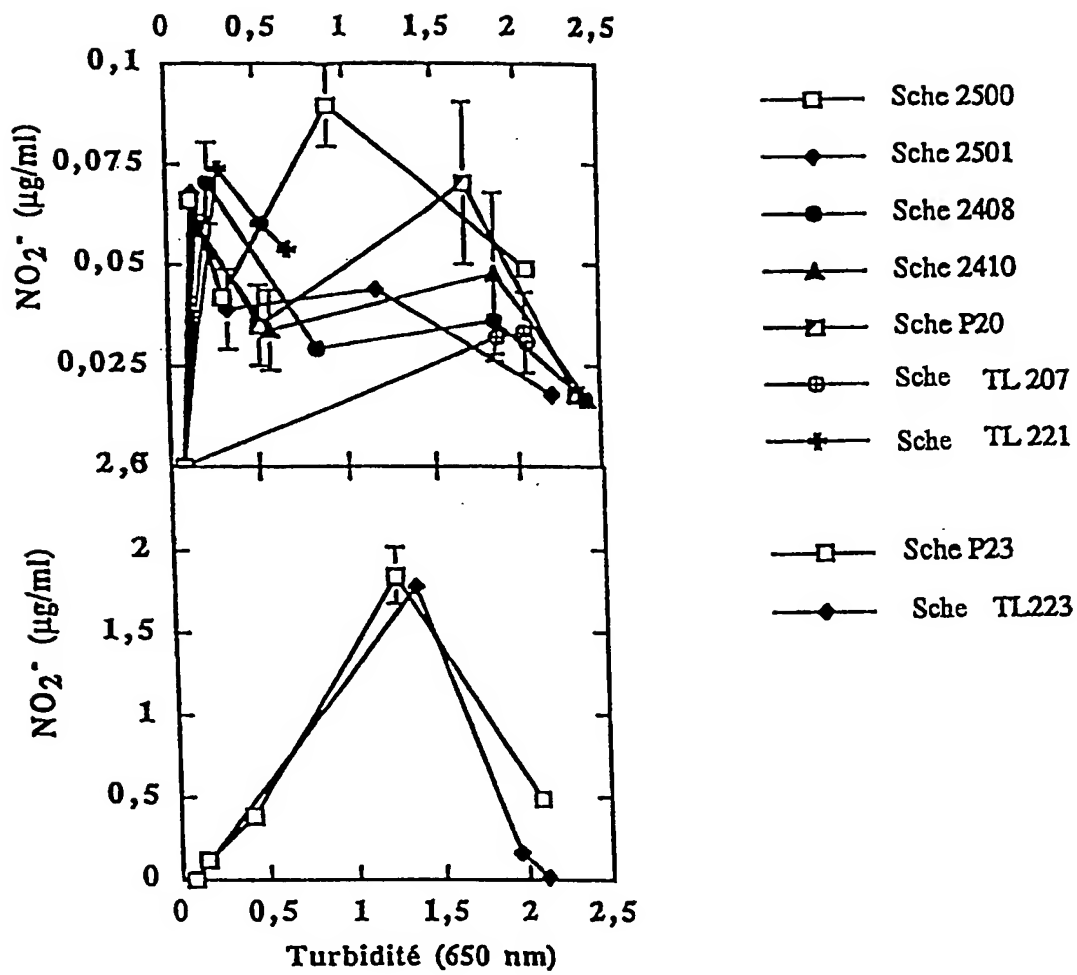


Figure 5

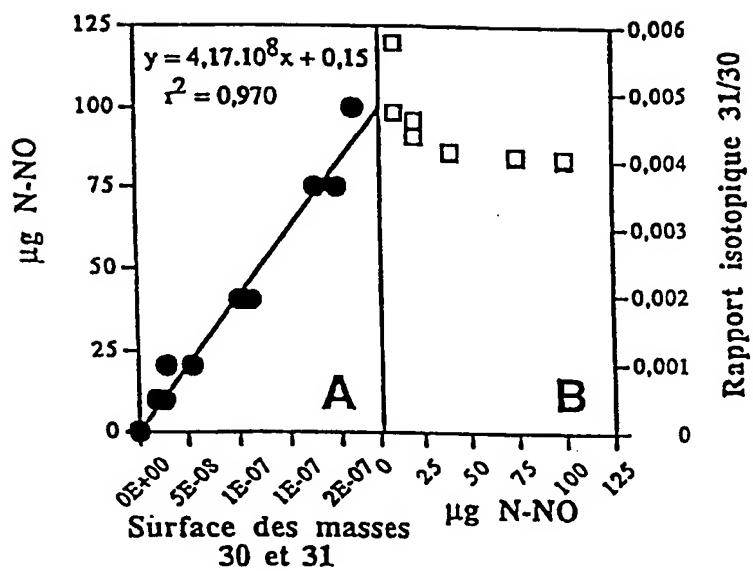


Figure 6

5/12

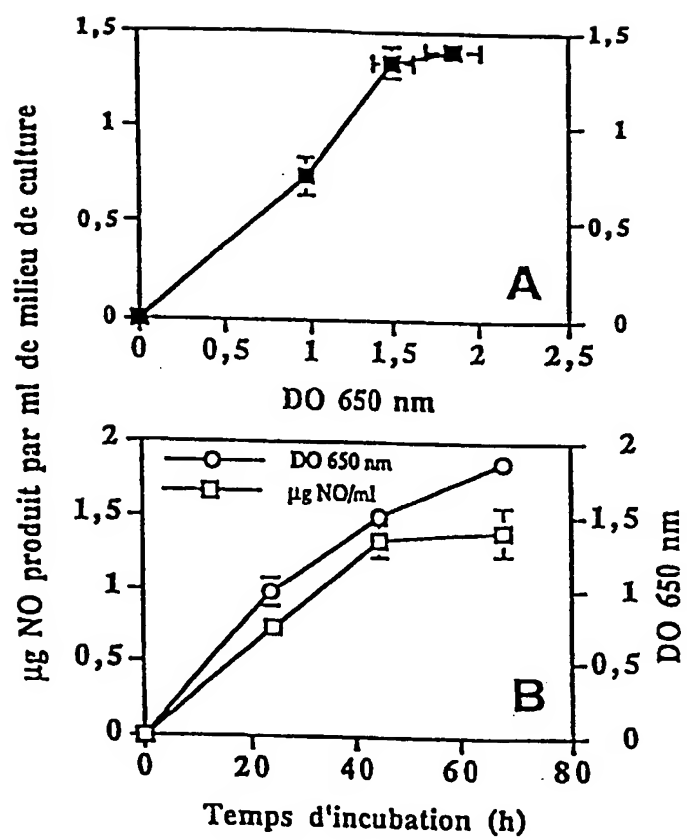


Figure 7.

6/12

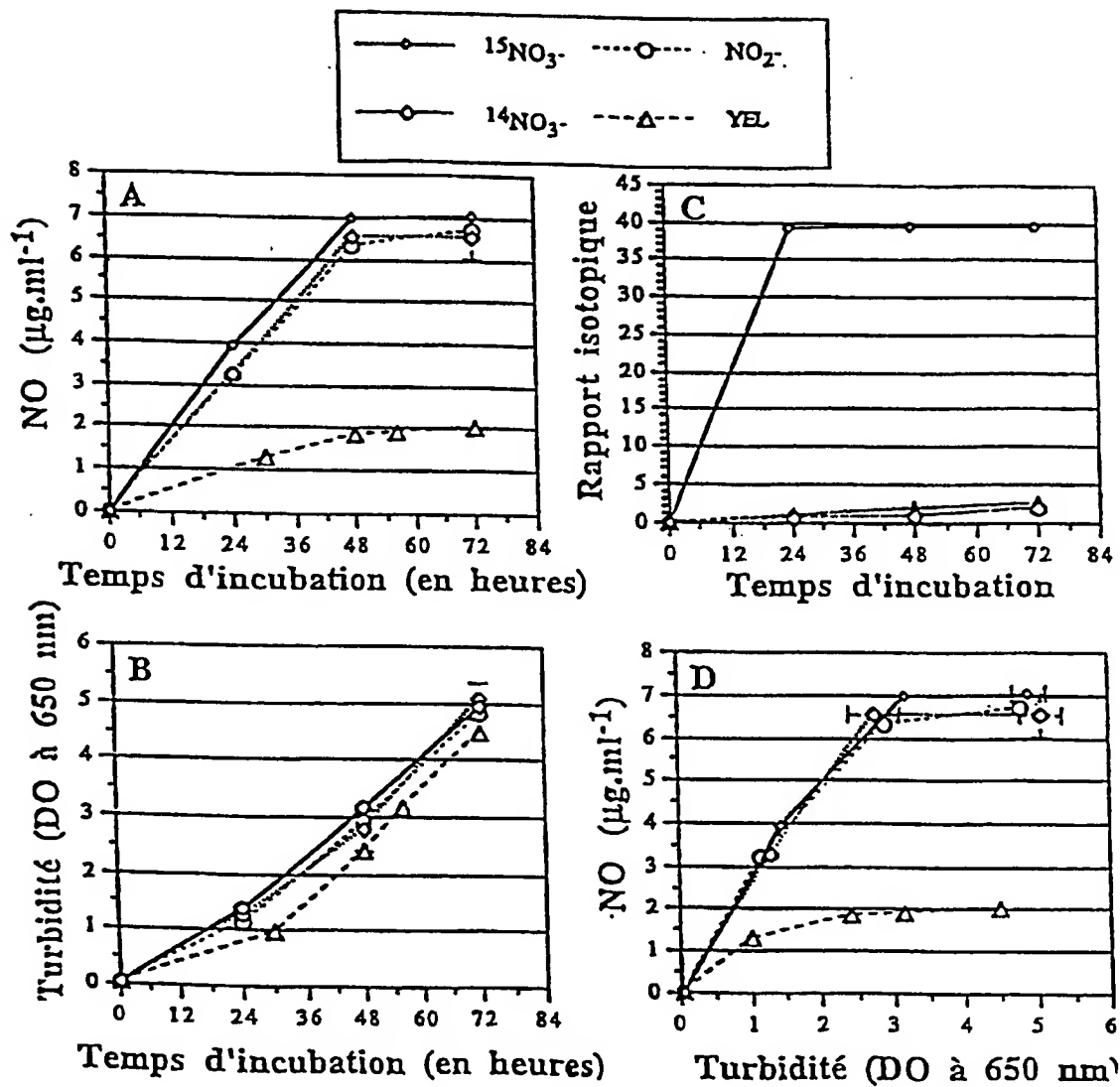


Figure 8

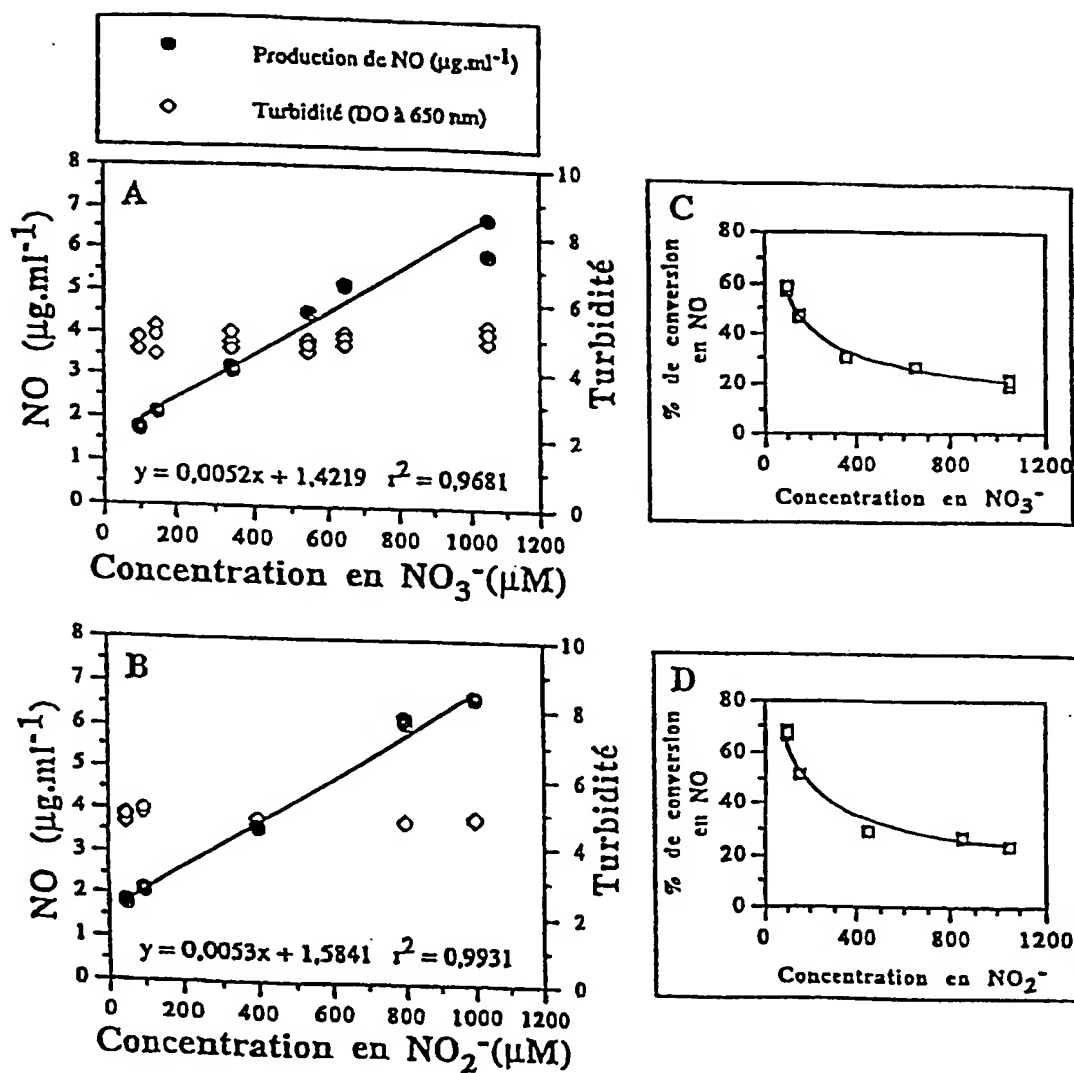


Figure 9

8/12

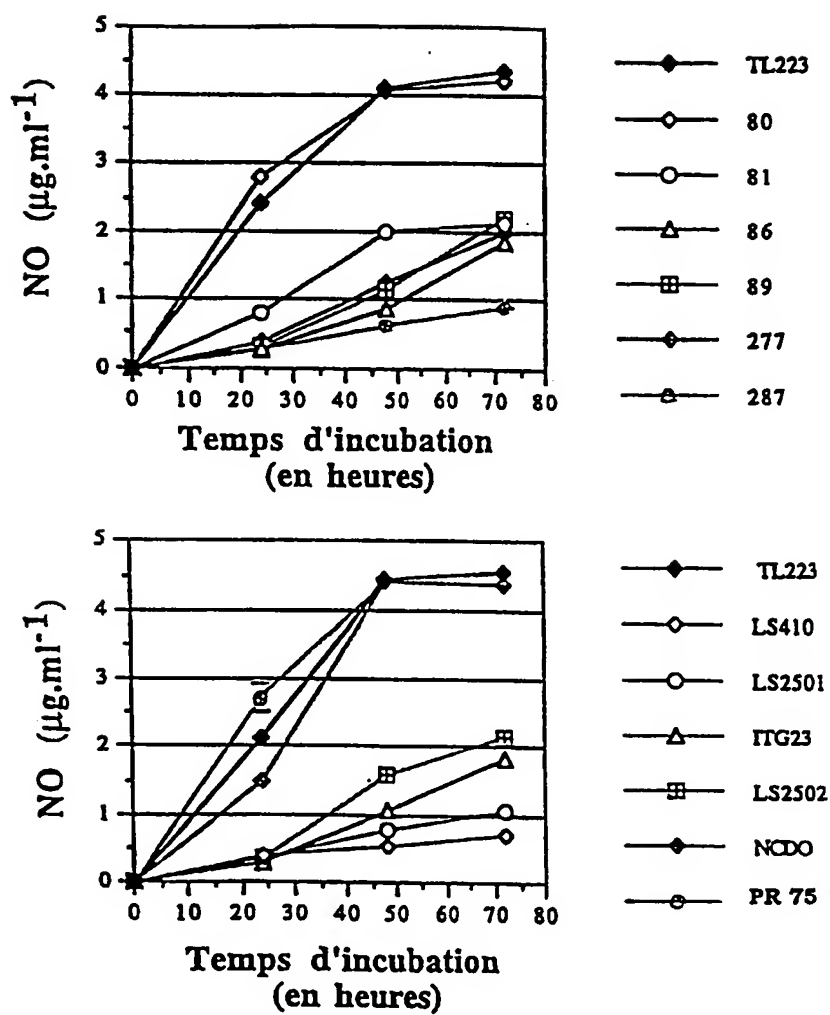


Figure 10

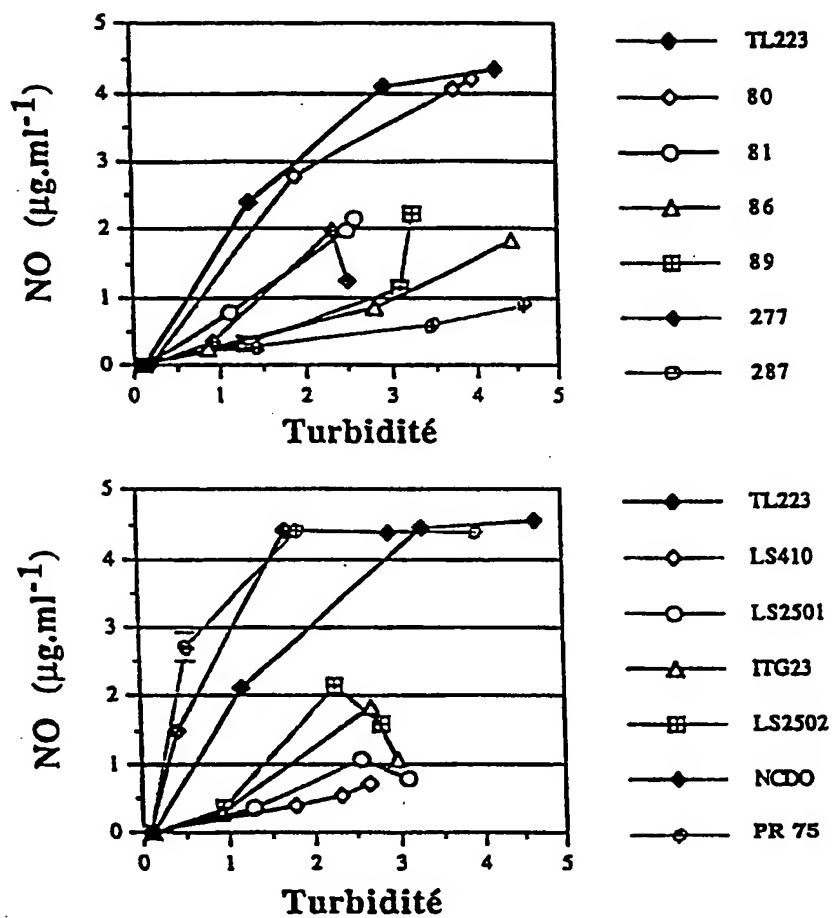


Figure 11

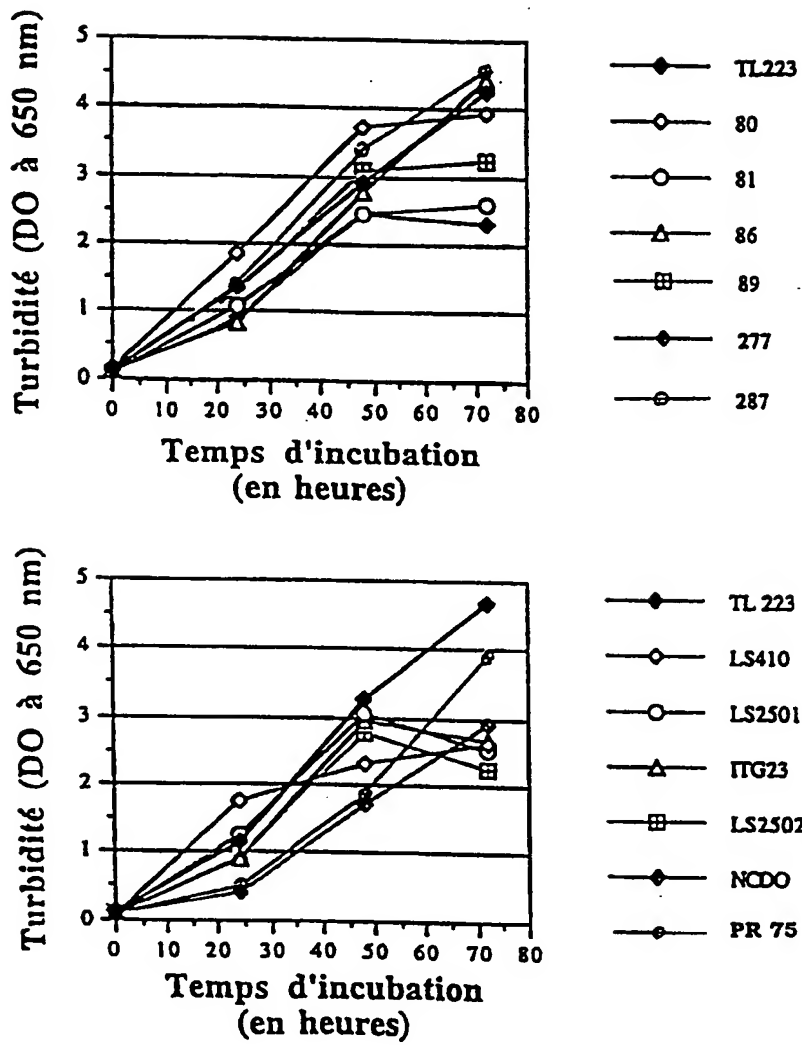


Figure 12

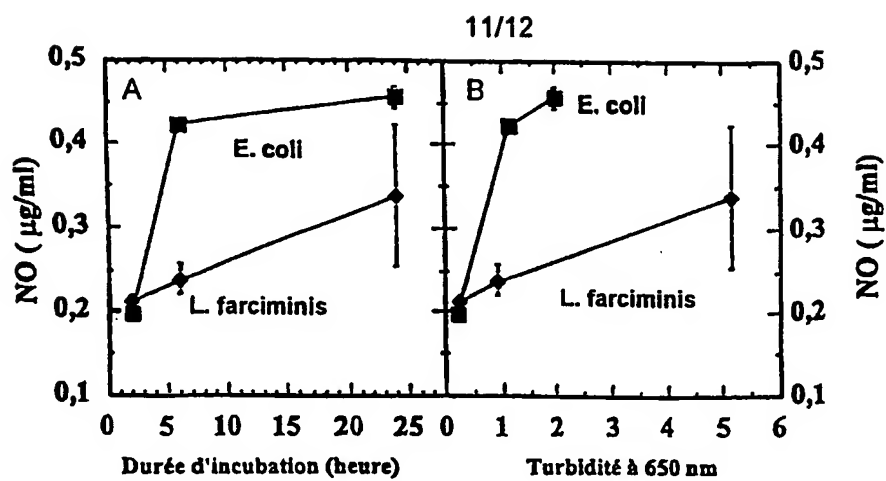


Figure 14

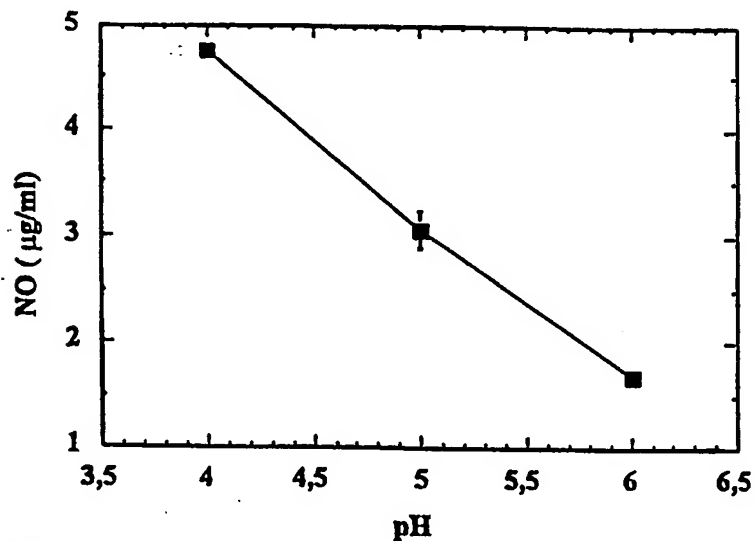


Figure 13

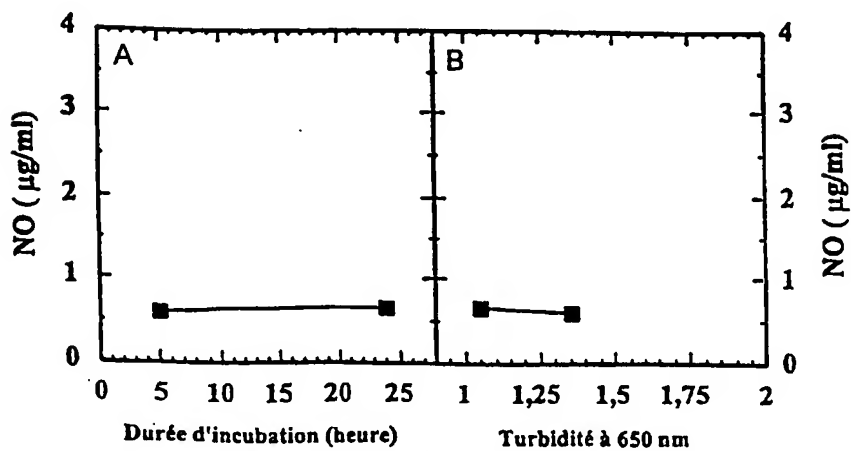


Figure 15

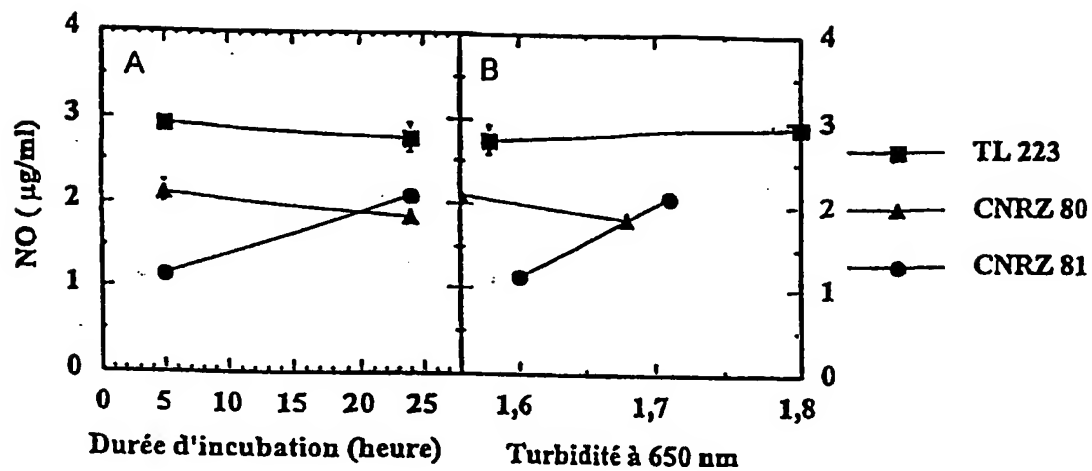


Figure 16

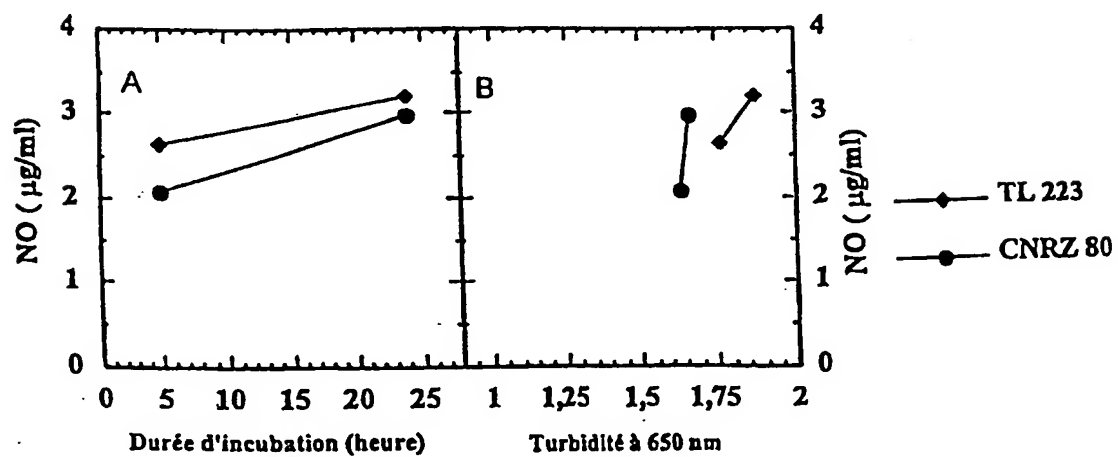


Figure 17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 97/02399

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 A61K35/74 A23L1/03 A23L1/308 A23C19/032

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 A61K A23L A23C

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 071 858 A (MILES LAB) 16 February 1983 see page 5, line 23 - page 6, line 22 ---	
A	DATABASE MEDLINE FILE SERVER STN KARLSRUHE ABR G 93363965, PAWLIK ET AL: "MICROCIRCULATORY AND MOTOR EFFECTS OF ENDOGENOUS NITRIC OXIDE IN THE RAT GUT" XP002039361 see abstract & JOURNAL OF PHYSIOLOGY AND PHARMACOLOGY, vol. 44, no. 2, June 1993, pages 139-146, --- -/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

7 May 1998

Date of mailing of the international search report

15/05/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Sitch, W

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 97/02399

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p> DATABASE MEDLINE FILE SERVER STN KARLSRUHE ABR G 93146090, CALIGNANO ET AL: "INVOLVEMENT OF ENDOGENOUS NITRIC OXIDE IN THE REGULATION OF RAT INTESTINAL MOTILITY IN VIVO" XP002039362 see abstract & EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACOLOGY, vol. 229, no. 2-3, 15 December 1992, pages 273-276, ----- </p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No

PCT/FR 97/02399

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0071858 A	16-02-1983	AU 8690782 A	10-02-1983
		DK 351682 A	07-02-1983
		JP 58036349 A	03-03-1983

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dema. Internationale No

PCT/FR 97/02399

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 6 A61K35/74 A23L1/03 A23L1/308 A23C19/032		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 6 A61K A23L A23C		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	EP 0 071 858 A (MILES LAB) 16 février 1983 voir page 5, ligne 23 - page 6, ligne 22 ---	
A	DATABASE MEDLINE FILE SERVER STN KARLSRUHE ABR G 93363965, PAWLIK ET AL: "MICROCIRCULATORY AND MOTOR EFFECTS OF ENDOGENOUS NITRIC OXIDE IN THE RAT GUT" XP002039361 voir abrégé & JOURNAL OF PHYSIOLOGY AND PHARMACOLOGY, vol. 44, no. 2, juin 1993, pages 139-146, --- -/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents		
<input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
* Catégories spéciales de documents cités:		
"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "&" document qui fait partie de la même famille de brevets		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée 7 mai 1998		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 15/05/1998
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé Sitch, W

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/FR 97/02399

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>DATABASE MEDLINE FILE SERVER STN KARLSRUHE ABR G 93146090, CALIGNANO ET AL: "INVOLVEMENT OF ENDOGENOUS NITRIC OXIDE IN THE REGULATION OF RAT INTESTINAL MOTILITY IN VIVO" XP002039362 voir abrégé & EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACOLOGY, vol. 229, no. 2-3, 15 décembre 1992, pages 273-276,</p> <p>-----</p>	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Dem. Internationale No

PCT/FR 97/02399

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 0071858 A	16-02-1983	AU 8690782 A	10-02-1983
		DK 351682 A	07-02-1983
		JP 58036349 A	03-03-1983
